

Undersøkingar av celler sin respons på intern bestråling med lågenergetiske elektron ved ultralåge doseratar

Ingunn Bjørhovde



Oppgåve for grada Candidata Scientiarum

Fysisk institutt
Universitetet i Oslo

Januar 2006

Føreord

Arbeidet med denne hovudoppgåva vart utført ved gruppa for biofysikk ved Fysisk institutt, Universitetet i Oslo, med unntak av flowcytometrimålingane som vart utført ved Det norske radiumhospital.

Eg vil fyrst og fremst takke rettleiaren min, professor dr. philos Erik Olai Pettersen for konstruktive tilbakemeldingar og rettleiing undervegs i arbeidet. Eg vil òg takke Charlotte Borka og Joe A. Sandvik for opplæring i celledyrking og assistanse under forsøka og dr. scient Pål Graff for utføring av flowcytometrimålingane.

Takk til alle på gruppa for biofysikk for eit godt miljø og koselege lunsjpausar. Ein spesiell takk til lesesalsjentene Kanutte, Camilla og Ellinor for lange skravlepausar, til Nina for diskusjonar og resultat til drøfting og til Kristine for all hjelp og nynorsksupport i eit elles så bokmålsorientert miljø. Takk til Anett for mange oppmuntrande ord og korrekturlesing.

Eg vil òg takke familien min for all støtte og oppmuntring undervegs. Og til slutt, ein stor takk til Hans Inge for at du alltid er så snill med meg og at du har tru på meg.

Blindern, januar 2006

Ingunn Bjørhovde



Samandrag

Humane celler sin respons på stråling endrar seg med varierende doseratar. I denne oppgåva har to humane cellelinjer vorte bestrålte med ultralåge doseratar for å kartleggje effekten av strålinga ved bestrålingstider på fleire veker. Det vart nytta celler frå brystkreftcellelinja T-47D og livmorhalskreftcellelinja NHIK 3025.

Celle- og kjernediametrane til desse cellene vart funne ved hjelp av fasekontrast- og fluorecensmikroskopiske undersøkingar. Dei midla cellediametrane vart funne til å vere $(14 \pm 1) \mu\text{m}$ og $(17 \pm 2) \mu\text{m}$, med tilhøyrande kjernediametrar på $(11 \pm 1) \mu\text{m}$ og $(13 \pm 2) \mu\text{m}$, for høvesvis T-47D- og NHIK 3025-cellene.

Cellene vart bestrålte i kultur ved at ei viss mengd av den radioaktive isotopen [^3H] (tritium) vart inkorporert i cellene. [^3H] var bunde til den essensielle aminosyra valin som vart inkorporert gjennom proteinsyntesen. Dosimetri- og effektforsøk vart gjort med spesifikk aktivitet på 1,5 Ci/mol i media. Inkorporeringsforløpet vart kartlagt for dei to ulike celletypene ved hjelp av væskescintillasjonsteljing. Det vart funne at radioaktiviteten hadde nådd eit stabilt nivå (*steady state*) i cellene etter om lag 100 timar. Doseratane og totaldosane til cellekjernane vart då berekna ut i frå ein modell for cellulær dosimetri utvikla av Goddu *et al.* (1997). Etter at *steady state* var nådd, vart doseratane til cellekjernen funne til å vere $(0,015 \pm 0,004) \text{ Gy/time}$ for T-47D-cellene og $(0,013 \pm 0,003) \text{ Gy/time}$ for NHIK 3025-cellene.

Doblingstidene til cellene vart bestemt både for celler som voks på medium med [^3H]-valin og for ubestrålte kontrollceller som voks på medium tilsett ikkje-radioaktiv valin. Det vart gjort eksperiment med celler som hadde vorte bestrålte i opp til 22 veker. Utover i bestrålingsforsøka vart det observert ei endring i doblingstid. Det viste seg at dei bestrålte cellene hadde generelt ei lenger doblingstid enn kontrollcellene.

Celleoverlevingsforsøk vart gjort for bestrålingstider opp til 20 veker. Det vart funne at både T-47D- og NHIK 3025-cellene tolererte bestrålinga gjennom heile bestrålingsperioden. Etter eit par veker bestråling vart det observert ei minke i overlevinga ned til om lag 60-80 %. Overlevinga heldt seg stabil på dette nivået og noko vidare minke vart ikkje observert.

Cellesyklusfordelinga til dei bestrålte cellene vart funne ved ulike tidspunkt i bestrålingsperiodane, ved hjelp av flowcytometri. Det vart ikkje funne noko tydeleg endring i celsesyklusfordelinga.

Innholdsliste

1	Innleiing.....	1
2	Teori.....	3
2.1	<i>Cellebiologi.....</i>	3
2.1.1	Cellesyklus.....	3
2.1.2	Regulering av cellesyklus.....	4
2.1.3	Cellevekst	6
2.2	<i>Strålingsfysikk</i>	7
2.2.1	Ioniserande stråling.....	7
2.2.2	Radioaktivitet.....	8
2.2.3	Stråling sin vekselverknad med materie.....	10
2.3	<i>Strålingsbiologi.....</i>	14
2.3.1	Cellulære strålingseffektar.....	14
2.3.2	Celleoverlevingskurver.....	16
2.3.3	Hypersensitivitet og indusert stråleresistens	17
2.3.4	Bystandereffekt og genomisk instabilitet	18
2.3.5	Bestråling med låg doserate	18
2.4	<i>Dosimetri</i>	19
2.4.1	Generelle omgrep	19
2.4.2	Ein modell for cellulær tritiumdosimetri	20
2.5	<i>Væskescintillasjonsteljing av β-emittarar.....</i>	23
2.6	<i>Flowcytometri</i>	26
3	Material og metodar	27
3.1	<i>Cellelinjer</i>	27
3.2	<i>Celledyrking</i>	27
3.2.1	Utstyr.....	27
3.2.2	Omsetjing	29
3.3	<i>Bestrålingsoppsett.....</i>	30
3.3.1	Inkorporering av tritium	30
3.3.2	Strålehygiene	30
3.4	<i>Måling av celle- og kjernestorleik</i>	31
3.4.1	Preparering av cellene	31
3.4.2	Mikroskopering og fotografering.....	32
3.4.3	Bildebehandling og –analyse	32

3.5	<i>Dosimetriforsøk</i>	34
3.5.1	Væskescintillasjonsteljing av β -emittarar	34
3.5.2	Preparering av celler og kjernar for scintillasjonsteljing	34
3.5.3	Bestemming av celletal	36
3.5.4	Inkorporeringskurver og doseberekning	36
3.6	<i>Bestemming av doblingstider</i>	36
3.6.1	Behandling av cellene	36
3.6.2	Berekning av doblingstidene	37
3.7	<i>Eksperiment for å måle celleoverleving</i>	38
3.7.1	Behandling av cellene	38
3.7.2	Berekning av celleoverleving	38
3.8	<i>Flowcytometri</i>	39
3.8.1	Preparering av cellene	40
3.8.2	Presentasjon av data	40
4	Resultat	43
4.1	<i>Celle- og kjernestorleik</i>	43
4.2	<i>Inkorporeringskinetikk</i>	45
4.3	<i>Berekning av doseratar og totaldosar</i>	47
4.4	<i>Doblingstider</i>	52
4.5	<i>Celleoverleving</i>	59
4.6	<i>Flowcytometridata</i>	61
5	Drøfting	63
5.1	<i>Dosar og doseratar</i>	63
5.1.1	Måling av inkorporert radioaktivitet	63
5.1.2	Celle- og kjernestorleik	63
5.1.3	Berekning av dosar og doseratar	67
5.2	<i>Doblingstider</i>	67
5.3	<i>Celleoverleving</i>	69
5.4	<i>Cellesyklusfordeling</i>	74
6	Konklusjon	77
	Referansar	79
	Appendiks A: Geometrisk reduksjonsfaktor og uttrykk for bremseevne	87
A.1	<i>Geometriske reduksjonsfaktorar</i>	87
A.2	<i>Uttrykk for bremseevne</i>	88

Appendiks B: Cellulære S-verdiar.....	89
Appendiks C: Kjemikalieliste.....	90
Appendiks D: Oppskrifter	91
Appendiks E: Radioaktivitet	93
Appendiks F: Vekstkurver	95
Appendiks G: Rådata frå celleoverlevingsforsøk	103
Appendiks H: DNA-histogram	108

1 Innleiing

Kreftceller karakteriserast av to arvelege eigenskapar; dei manglar den normale vekstkontrollen og deler seg derfor ukontrollert, i tillegg til at dei invaderer og koloniserer område som normalt er reservert for andre celler (Alberts *et al.*, 2002, s. 1314). Det er mange faktorar som kan bidra til at risikoen for å utvikle kreft aukar, blant anna ulike kjemikaliar (frå til dømes røyking eller feil kosthald), ioniserande stråling, virus og bakteriar. Faktorar som kan framkalle utvikling av kreft seiast å ha ein karsinogeneffekt. Desse verkar gjennom ein trinnvis prosess som startar med ein serie genetiske endringar/mutasjonar og som stimulerer cellene til å dele seg (Radiumhospitalet, 2005).

Alle skapningar utsetjast for stråling, frå både naturlege og kunstige strålekjelder. Det største bidraget til gjennomsnittsdosen til befolkninga kjem frå naturleg bakgrunnsstråling. Bakgrunnsstråling består av blant anna kosmisk stråling og stråling frå naturlege radioaktive kjelder på jorda. Totaldosane etter slik eksponering er små og gjennomsnittleg dose per år i Noreg er om lag 2 mGy (Henriksen og Henriksen, 1998).

Som sagt kan store dosar av stråling vere med på å auke risikoen for å utvikle kreft. Likevel står ioniserande stråling sentralt i kreftbehandling. Stråling brukast både til å kurere kreft og for å lindre symptoma ved kreft. Ved strålebehandling påverkast cellene si evne til å dele seg ved at strålinga gjev skader i cella sitt DNA. Ein kreftsvulst vil då slutte å vekse, skrumpe inn og døy. Målet med behandlinga er å gje ein stråledose stor nok til å drepe kreftcellene, med minst mogeleg skade i dei omkringliggjande friske cellene. Normalvevet i og rundt ein svulst vil alltid få ei viss doseavsetjing. Det er viktig å finne ein balanse mellom det å få kontroll på svulsten ved å drepe alle kreftcellene og samstundes beskytte dei involverte normale cellene.

Doseratane som strålinga vert levert med, er avhengig av bestrålingsoppsettet. Ved ekstern stråleterapi er doseratane generelt store, på fleire Gy per minutt, medan doseratane ved brachyterapi (strålebehandling utført med den radioaktive strålekjelda plassert inne i kroppen/svulsten) kan vere ned mot 0,5 Gy/time. Strålefølsemda til celler varierer med dei varierende doseratane. Ein senka doserate vil generelt redusere den biologiske effekten av totaldosen. Celleoverlevinga stig då med avtakande doserate og vert forklart ved at den auka bestrålingstida gjev cellene betre tid til å reparere stråleskader, at stråleindusert cellesyklusarrest vert mindre utprega ved låge doseratar og at celledeling (repopulasjon) under bestråling bidreg til å redusere strålefølsemda til cellepopulasjonen (Hall, 2000). Når kreft vert behandla med stråleterapi, vert dei store dosane og doseratane avsett i eit målområde som definerast av kreftsvulsten. Det omliggjande vevet vert også utsett for stråling, men ved lågare doseratar og totaldosar. Det er viktig å vite kva slags effektar denne

strålinga har. Tidlegare studiar har undersøkt humane kreftceller sin respons på lågdoseratebestråling (Mitchell *et al.*, 1979, Marin *et al.*, 1991, Furre *et al.*, 1999 og 2003, DeWeese *et al.*, 1998, Mitchell *et al.*, 2002). Furre *et al.* (1999, 2003) nytta doseratar ned til 0,33 Gy/time. Det vart i desse arbeida vist at celleoverlevinga vert redusert tilnærma lineært med aukande dose ved doseratar i området 0,94-0,33 Gy/time. Det vart vist ei doseavhengig akkumulering av celler i G₂-fase, som for livmorhalskreftcellelinja NHIK 3025 gav seg uttrykk i ein såkalla invers doserateeffekt. Det vil seie at celleoverlevinga for celler som fekk dosar over om lag 7 Gy vart redusert når doseraten vart redusert frå 0,94 til 0,33 Gy/time. Celler frå brystkreftcellelinja T-47D viste ikkje ein slik invers doserateeffekt, for denne celletypen auka celleoverlevinga når doseraten vart senka i det same doserateområdet.

Søvik (2002) undersøkte T-47D-celler sin respons på stråling med doseratane 0,041 og 0,010 Gy/time. Strålinga vart levert ved hjelp av tritium inkorporert i proteinet til cellene og det vart lagt stor vekt på å kartlegge dosimetrien ved eit slikt bestrålingsoppsett. I tillegg vart det gjort effektforsøk på cellene i dei to fyrste bestrålingsvekene, der doblingstid, celleoverleving og cellesyklusfordeling vart undersøkt. Ved den lågaste doseraten vart det ikkje observert nokon signifikante endringar i verken doblingstid eller celleoverleving. Ved den høgaste doseraten vart det vist ei auke i doblingstida og ein reduksjon i celleoverlevinga i løpet av den andre bestrålingsveka. Det vart ikkje observert noko endring i cellesyklusfordeling ved nokon av doseratane.

I denne oppgåva ynskte vi å vidareføre dei innleiande forsøka gjort av Søvik (2002) ved å nytte den lågaste doseraten og bestråle cellene over fleire veker. Vi nytta den same cellelinja som Søvik, T-47D, i tillegg til å bruke celler frå cellelinja NHIK 3025. Eksperimenta til Furre *et al.* (1999, 2003) indikerer at der er ein skilnad mellom desse to celletypene med omsyn på følsemda ved lågdoseratebestråling. Stråleresponsen vart målt i form av endring i vekstfart, det vil seie auke i celletal per tidseining, og den kolonidannande evna til cellene som funksjon av totaldose.

2 Teori

2.1 Cellebiologi

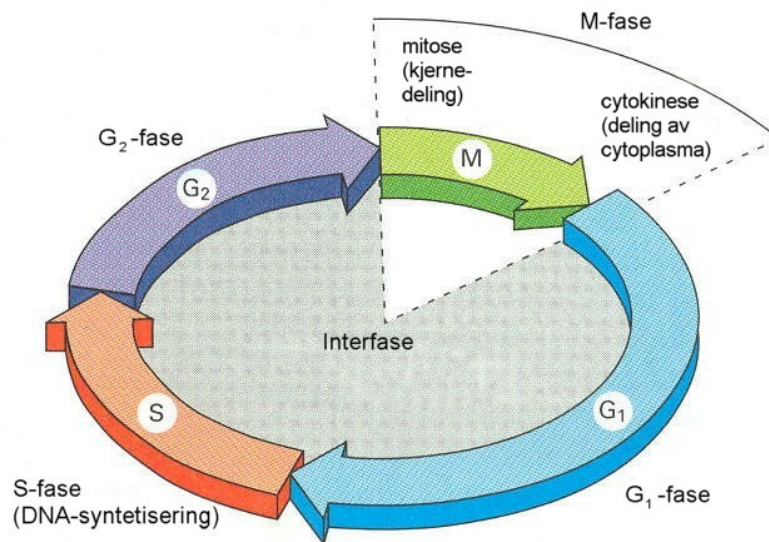
Kapittel 2.1.1 og 2.1.2 er basert på Alberts *et al.*, 2002 og Hall, 2000.

2.1.1 Cellesyklus

Cellers vekst og deling er prosessar som repeterast i ein sekvens kalla cellesyklus. Cellesyklus er delt inn i to hovudfasar; interfase og M-fase (M=mitotisk). I interfase veks cella, medan ho deler seg i M-fasen. Figur 2.1 viser dei ulike stadia i cellesyklus.

Interfase er den delen av cellesyklus der cella førebur seg på celledelinga gjennom vekst og DNA-replikasjon. Interfase er delt inn i tre underfasar; G_1 , S og G_2 ($G = gap$, S = syntese). DNA-replikasjonen skjer i S-fasen. I dei to *gap*-fasane veks cella og doblar proteina og organellane sine, medan ho overvaker sitt indre og ytre miljø for å sikre at forholda er høvelege for DNA-syntetisering og mitose. Lengda på alle fasane varierer for ulike celler ved ulike høve, men størst variasjon finn ein i lengda av G_1 -fasen. Frå G_1 kan celler, dersom forholda ikkje er høvelege for DNA-syntese, gå inn i ein kvilefase; G_0 . Celler kan bli i kvilefasen i kortare eller lengre tid, før dei eventuelt går tilbake i cellesyklus.

M-fasen varer i dei fleste celler i om lag ein time og delast inn i to delar; mitose, der cellekjernen deler seg og cytokinese, der sjølve cella vert delt i to nye celler. Mitose er igjen delt inn i fem delar og startar med profase. I profase vert cellas dupliserte DNA kondensert til kromosom. Deretter følgjer prometafasen der kjernemembranen brytast ned og den mitotiske spindelen vert festa til kromosompara. Den mitotiske spindelen trekkjer så kromosoma mot midten av cella der dei i metafasen organiserast langs det såkalla metafaseplanet. I anafasen vert kromosompara trekte frå kvarandre mot motståande polar i cella. Dei kondenserte kromosoma løyser seg opp i telofasen og to nye kjernar vert danna.



Figur 2.1: Oversikt over dei ulike cellyklusfasane. Interfase består av G₁, S og G₂, i denne fasen veks cella og doblar DNA-innhaldet sitt. I M-fase deler cella seg til to dotterceller (Alberts et al. 2002, fig. 17-13, figuren er modifisert).

2.1.2 Regulering av cellyklus

Cellyklus er nøye regulert, både av cella sjølv og av organismen. Cella sin progresjon gjennom cellyklus regulerast av ei rekkje proteinkompleks kalla cellykluskontrollen. Dei viktigaste proteina er syklin og syklinavhengige kinasar (cdk). Når syklin bindast til cdk, fosforilerast utvalde protein som dermed set i gang dei ulike prosessane i cellyklus. Cdk-nivået er konstant gjennom cellyklus, medan mengda syklin varierer syklisk med syntese og degradering. Dersom syklin-cdk-kompleksa ikkje er aktiverte, vert cella heldt tilbake i såkalla kontrollpunkt. Tre kontrollpunkt er mest framtrедande; G₁k, G₂k og Mk.

I kontrollpunktet i G₁ (G₁k) avgjerast det om forholda inni og utanfor cella ligg til rette for DNA-syntese og om DNA er uskada. Dersom miljøet utanfor cella ikkje er passande for vidare progresjon i cellyklus, kan cella gå inn i ein spesialisert kvilefase G₀, der ho kan bli verande på ubestemt tid. Ved hjelp av vekstfaktorar utanfrå kan cella seinare gå tilbake til G₁-fasen og fortsette cellyklus. Dersom DNA er skadd kan cella haldast tilbake i G₁k slik at skadane anten vert reparerte og cella kan fortsette i cellyklus, eller ho kan gjennomgå apoptose, cellulært sjølv-mord.

I kontrollpunktet i G_2 (G_2k) avgjer cella om DNA-syntesen var vellukka før cella sleppast inn i M-fasen. Stråleinduserte enzym kan også stanse cella tidlegare i G_2 , for å gi cella tid til å reparere stråleskadd DNA, slik at ein unngår at DNA vert feil fordelt til dottercellene under mitosen.

I kontrollpunktet i M-fase (Mk) vert det kontrollert at kromosoma er skikkeleg festa til den mitotiske spindelen.

I kvilefasen G_0 finst eit anna viktig kontrollpunkt (G_0k) der det avgjerast om mengda vekstfaktorar er tilstrekkeleg til at cella kan forlate G_0 og gå inn i syklus igjen. Binding av ekstracellulære vekstfaktorar på celleoverflata resulterer i at vekstfremmande gen, proliferasjonsgen aktiverast inne i cella. Desse proliferasjonsgena kodar for protein som kan bringe cella forbi G_0k og inn i cellesyklus igjen. Normalt har ikkje celler i G_0 desse proteina, men ein mutasjon i genet kan føre til at proteina produserast utan at genet er aktivert av ein vekstfaktor. Dette fører til ukontrollert celledeling og kan vere det fyrste steget på vegen mot utvikling av kreft. Eit slikt mutert proliferasjonsgen kallast då eit onkogen. Ei rekkje protein som finst i cellene i G_0 er produkta av antiproliferasjonsgen, også kalla tumorsupressorgen. Desse gena er med på å forhindre kreftutvikling, sidan dei hemmar cellesyklus. Viktige tumorsupressorgen er p53, pRB og ATM.

Tumorsupressorgen

Under normale tilhøve finst proteinet p53 nesten ikkje i cellene, men dersom cellene vert utsett for til dømes ioniserande stråling som induserer DNA-skade, aukar konsentrasjonen av p53 kraftig. Cella vert hindra i å gå inn i S-fase med skadd DNA ved at den vert arrestert i G_1k og får tid til å reparere skadane. Dersom reparasjonen av DNA er mislykka, døyrr cella ved apoptose. p53-genet er mutert i halvparten av alle humane krefttilfelle.

pRB er proteinet til retinoblastomgenet RB. pRB har ei rekkje fosforyleringsseter og er aktivt mot fleire protein. Generelt reknast pRB for å vere aktivt i defosforylert tilstand. Då bind pRB seg til proliferasjonsprotein og hemmar desse, slik at dei ikkje er i stand til å bringe cellene vidare i cellesyklus. pRB finst alltid i cella, men aktiviteten varierer med fosforyleringsgraden. I G_0 er pRB defosforylert og hindrar proliferasjon, medan fosforyleringsgraden i prolifererande celler aukar mot slutten av G_1 . pRB er så fosforylert gjennom S og G_2 før den går tilbake til defosforylert tilstand i M-fasen. pRB er nødvendig for kontrollpunktet i G_1 -fase og spelar ei essensiell rolle i signalvegen som setjast i gang ved DNA-skade og som er styrt av blant anna p53 (Harrington *et al.*, 1998).

ATM (Ataxia Telangiectasia mutert) er eit tumorsuppressorgen assosiert til sjukdomen Ataxia Telangiectasia. Denne sjukdomen gjer celler strålefølsame og fører til at sannsynet for å få kreft aukar (Savitsky *et al.*, 1995). Proteinet ATM er ein kinase som vert aktivert av ioniserande stråling og som representerer ein rask respons på dobbeltrådbrot (Bakkenist og Kastan, 2003). ATM spelar ei viktig rolle for kontrollpunkt i alle fasane av cellesyklus (Xu *et al.*, 2002). I mange høve er det proteinkinase ATM som fosforylerer og dermed styrer aktiviteten av p53 (Canman *et al.*, 1998, Banin *et al.*, 1998).

2.1.3 Cellevekst

Celler i kultur vil vanlegvis dele seg med faste intervall, så lenge dei har gunstige vekstvilkår. Det karakteristiske for celler med gode vekstvilkår er at celletalet doblast med bestemte intervall. Den tida det tar før celletalet er dobla, kallast doblingstida. For celler med eksponensiell vekst kan talet på celler N som funksjon av tida t finnast utifrå uttrykket:

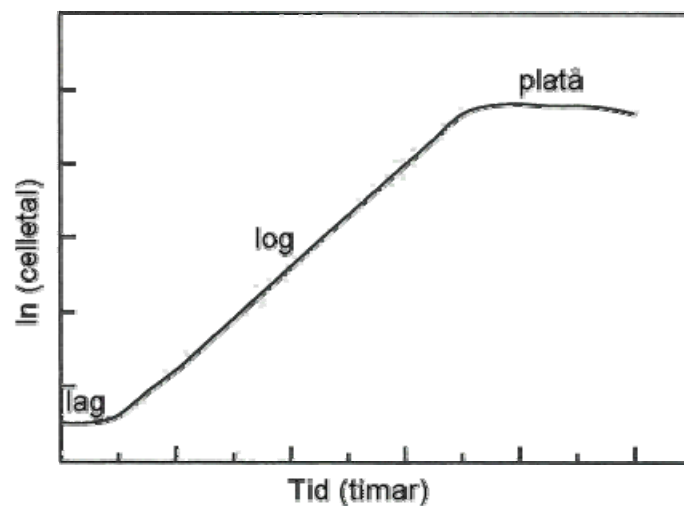
$$N(t) = N_0 e^{bt} \quad (2.1)$$

der N_0 er celletalet ved tida $t = 0$ og b er ein parameter relatert til vekstfarten til cellene.

Doblingstida til cellene vert gjeven som:

$$t_2 = \frac{\ln 2}{b} \quad (2.2)$$

Ei grafisk framstilling av celletalet som funksjon av tida, kallast ei vekstkurve. Vekstkurver framstillast gjerne i eit halvlogaritmisk diagram, med tida langs ein lineær x-akse og celletalet langs ein logaritmisk y-akse. Celler som veks eksponensielt, vil i eit slikt diagram gi ei rett linje med stigningskoeffisient b . Eit eksempel er vist i figur 2.2.



Figur 2.2: Vekstkurve. Figuren viser tid langs ein lineær x-akse og celletal langs ein logaritmisk y-akse (Kielberg et al., 2001, figuren er modifisert).

Ei vekstkurve avviker ofte frå den eksponensielle veksten i starten og mot slutten av kurva. I starten kan der vere ein periode med ingen eller langsam vekst, ein såkalla *lagfase*. Det kan vere mange grunnar til forseinkinga i vekst, blant anna at cellene nettopp har vore utsett for trypsinering og ikkje har kome seg etter dette eller at dei har fått tilført friskt medium som ikkje inneheld dei vekstfremjande stoffa som cellene gjev frå seg til mediet. Etter *lagfasen* kjem ein periode med eksponensiell vekst, *logfasen*, der så godt som alle cellene i kulturen er i vekst. Denne fasen følgjast av ein fase der vekstkurva flatar ut til den såkalla *platafasen*. Dette plataet kjem av at cellene har nådd konfluens, det vil seie at dei dekkjer heile botnen i celleflaska og dermed sluttar å dele seg. Plataet kan også kome av ei opphoping av veksthemmande avfallsstoff i mediet eller at tettheten av celler er så stor at det ikkje vert tilført nok medium til å halde veksten i gang (Kielberg *et al.*, 2001).

2.2 Strålingsfysikk

2.2.1 Ioniserande stråling

Ioniserande stråling er stråling med nok energi til å eksitere og ionisere atom. Energien som trengs for å slå laus eit valenselektron frå eit atom ligg i området 4–25 eV og stråling må difor ha ein energi over dette for å bli kalla ioniserande. Direkte ioniserande stråling består av ladde partiklar, som elektron, proton og ladde kjernar. Partiklane avset energien direkte i mediet gjennom coulombvekselverknader langs sporet til partikkelen. Indirekte ioniserande stråling

består av foton og uladde partiklar som nøytron. Desse overfører energi til ladde partiklar i mediet og desse ladde partiklane avset så energien som for direkte ioniserande stråling (Attix, 1986).

2.2.2 Radioaktivitet

Radioaktivitet er spontan emisjon av energi frå ein ustabil kjerne. Energien vert frigjort ved at kjernen sender ut stråling i form av partikkelstråling eller elektromagnetisk stråling.

Radioaktivitet er eit statistisk fenomen og sannsynet for at ein slik radioaktiv desintegrasjon vil skje i løpet av eit bestemt tidsintervall er konstant (Khan, 1992). Talet på desintegrasjonar pr. tidseining dN/dt er proporsjonalt med talet radioaktive kjernar N tilstades. Det vil seie:

$$-\frac{dN}{dt} = \lambda N \quad (2.3)$$

der λ er ein konstant kalla desintegrasjonskonstanten. Minusteiknet indikerer at talet på radioaktive atom minkar med tida. Likning (2.3) gjev følgjande uttrykk for N som funksjon av tida t :

$$N = N_0 e^{-\lambda t} \quad (2.4)$$

der N_0 er talet på radioaktive kjernar ved tida $t=0$.

Aktiviteten til eit radioaktivt materiale er definert som talet på kjernar som desintegrerer pr. tidseining. Dette gjev:

$$A = -\lambda N \quad (2.5)$$

som også kan skrivast som:

$$A = A_0 e^{-\lambda t} \quad (2.6)$$

der A er aktiviteten ved tida t og A_0 er den opphavlege aktiviteten lik λN_0 . Eininga for aktivitet er *curie* (Ci), definert som

$$1 \text{ Ci} = 3,7 \times 10^7 \text{ desintegrasjonar/sekund (dps)}$$

SI-eininga for aktivitet er *becquerel* (Bq), som er definert som

$$1 \text{ Bq} = 1 \text{ dps} = 2,70 \times 10^{-11} \text{ Ci}$$

Tida det tek før talet på radioaktive kjernar eller aktiviteten til det radioaktive materialet er halvert i høve til initialverdi, er halveringstida $T_{1/2}$. Denne halveringstida er gjeven som:

$$T_{1/2} = \frac{\ln 2}{\lambda} \quad (2.7)$$

Tritium

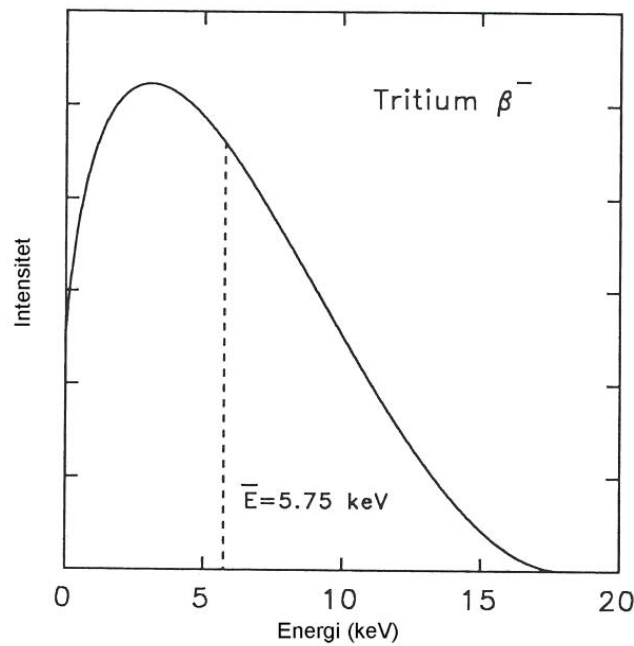
Tritium, [^3H], er ein radioaktiv hydrogenisotop med to nøytron og eit proton i kjernen. Den emitterer lavenergetiske β -partiklar og har ei halveringstid $T_{1/2}$ på 12,32 år. Tritium brukast innan forskning, industri og medisin og må produserast kunstig til dette, då dei naturlege førekomstane er svært små.

Tritium vert danna naturleg i store høgder, gjennom kjernereaksjonar når atmosfæren treffast av kosmisk stråling. Tritium kombinerer så med hydroksidion til tritiert vatn og fell til jorda som regn eller snø (Feinendegen, 1967). Kunstig produksjon skjer enten i akseleratorar, der nøytron reagerer med heliumgass, eller i reaktorar, der nøytron bombarderer litium (Rowberg, 2001).

Tritium har ein ustabil kjerne på grunn av den lave bindingsenergien mellom dei tre kjernepartiklane. Tritium desintegrerer til den stabile heliumisotopen [^3He] ved emisjon av eit elektron og eit nøytrino:



Energien frigjeven i denne reaksjonen er konstant, fordi reaksjonen er ein direkte overgang mellom to diskrete energinivå. Elektronet sitt energispektrum er kontinuerlig, sidan energien fordelast mellom elektronet og nøytrinoet. Energispekteret til dei emitterte elektrona frå tritium er vist i figur 2.3. Den maksimale elektronenergien frigjeven ved tritiumdesintegrasjon er 18,6 keV medan gjennomsnittsenergien er på 5,75 keV (Feinendegen, 1967). Den maksimale rekkjevidda til elektrona i luft vert følgeleg om lag 6 mm og den gjennomsnittlege rekkjevidda om lag 1 mm (definisjon av rekkjevidde er gjeven i kap. 2.2.3). For dosimetriske føremål reknast celler som vassekvivalente, difor er rekkeviddene i vatn av interesse (Nikjoo, 1991). Desse korresponderande rekkjeviddene er 6 μm og 1 μm (ICRP, 1983).



Figur 2.3: Energispekteret til β -strålinga frå tritium (Morstin et al., 1993, figuren er modifisert).

2.2.3 Stråling sin vekselverknad med materie

Energiavsetjing

I dette arbeidet er det brukt stråling i form av lavenergetiske elektron frå tritium. Det vil difor i det følgjande berre bli presentert vekselverknadsteori som gjeld for slike elektron.

Ein ladd partikkel vekselverkar med materie gjennom elastiske og inelastiske kollisjonar med enten atomelektron eller atomkjernen.

I elastiske prosessar er den kinetiske energien bevart. Sidan energimengda overført frå elektronet til mediet er svært lita, er ikkje elastisk spreining ein viktig mekanisme for energiavsetjing, men det er derimot ein viktig mekanisme for elektronavbøying.

Inelastiske spreingsprosessar er prosessar der den kinetiske energien ikkje er bevart. Elektronet kan altså ionisere eller eksitere det atomet eller molekylet det vekselverkar med. Dersom elektronet passerer nært nok atomet til at det kan vekselverke direkte med atomkjernen, vil elektronet verte bremsa i coulombfeltet til atomet og sende ut eit foton. Denne bremsestrålinga er ein viktig energiavsetjingsmekanisme for høgenergetiske elektron i

materiale med høgt atomnummer, men er relativt uviktig i medium med lågt atomnummer, som vatn, for elektron med lågare energi enn 10 MeV. Eit innkomande elektron kan elles spreiaast inelastisk gjennom mjuke (*soft* eller *glancing*) eller harde (*hard* eller *knock-on*) kollisjonar. I ein mjuk kollisjon passerer elektronet så langt frå atomet eller molekylet at det påverkar det som ei heil eining anten ved eksitasjon til eit høgare energinivå eller ionisasjon, der eit valenselektron vert slått ut. Dersom elektronet passerer nært atomet eller molekylet, kan det i ein hard kollisjon vekselveke direkte med eit atomelektron og slå dette laus. Dette sekundærelektronet kan ha nok energi til å ionisere eller eksitere andre atom eller molekyl og vil i det tilfelle avsetje eit partikkelspor separat frå det til primærpartikkelen. Eit slikt sekundærelektron kallast eit δ -elektron (Attix, 1986).

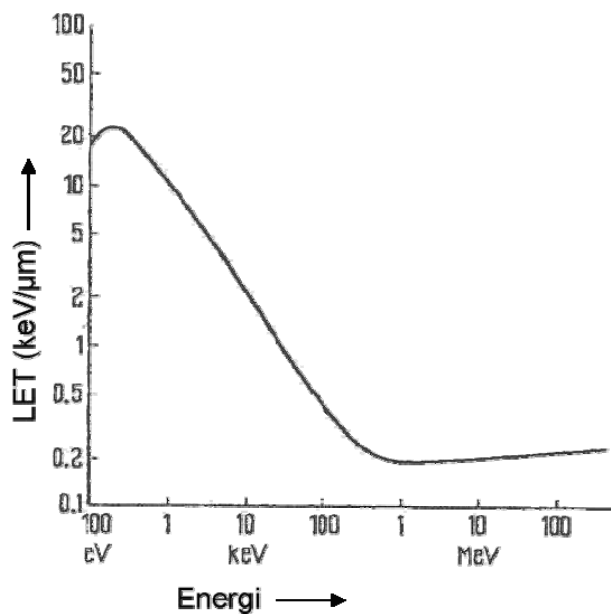
Mjuke kollisjonar er den mest sannsynlege spreingsprosessen, men den overførte energien i mjuke kollisjonar er betrakteleg mindre enn ved harde. Dei to kollisjonstypene bidreg difor omtrent like mykje til den totale energien avsett ved inelastiske prosessar.

Bremseevne (*Stopping Power*)

Bremseevna til elektrona gjev eit mål på energiavsetjinga deira i mediet. For eit elektron med ein gjeven kinetisk energi T i eit gjeve medium, er bremseevna dT/dx definert som forventningsverdien til energitapsraten per lengdeining x i mediet. Bremseevna tek ikkje omsyn til at δ -elektron frå harde kollisjonar kan vere energetiske nok til å transportere den avsette energien langt vekk frå sporet til primærpartikkelen. Energimengda som primærpartikkelen avset vil verte overestimert og ein kan difor definere ei avgrensa bremseevne, også kalla *linear energy transfer*, LET (Attix, 1986).

Linear Energy Transfer (LET)

Linear energy transfer er den delen av bremseevna som inkluderer alle mjuke kollisjonar pluss dei harde kollisjonane som resulterer i δ -elektron med ein energi lågare enn ein grenseverdi Δ . LET målast i kiloelektronvolt per mikrometer (keV/ μm). Elektron med høg energi og foton er eksempel på låg-LET stråling, medan større partiklar som proton, nøytron og ion er eksempel på høg-LET stråling (Hall, 2000). β -strålinga nytta i dette arbeidet er rekna som låg-LET partikkelstråling (Straume og Carsten, 1993, Pouget og Mather, 2001, Petchu *et al.*, 2002), men elektrona frå [^3H]-desintegrasjon kan ha ein relativt høg LET-verdi mot slutten av ionisasjonssporet sitt (Radford, 2002). Figur 2.4 viser korleis LET-verdien for elektron varierer med energien. Som vist i figur 2.3, har elektrona nytta i dette arbeidet eit kontinuerleg energispektrum. Tilhøyrande LET-verdi ligg då i intervallet frå om lag 1,5 til 20 keV/ μm .



Figur 2.4: LET som funksjon av partikkelenergi for elektron (Dertinger og Jung, 1970, figuren er modifisert).

Tabell 2.1 viser LET-verdiar for andre typar stråling. Vi ser at LET-verdiane for både 200 keV røntgenstråling og 2 MeV protonstråling ligg innan intervallet for [^3H]-elektrona sin LET-verdi.

Tabell 2.1: LET-verdiar for ulike typar stråling (Dertinger og Jung, 1970, tabellen er modifisert).

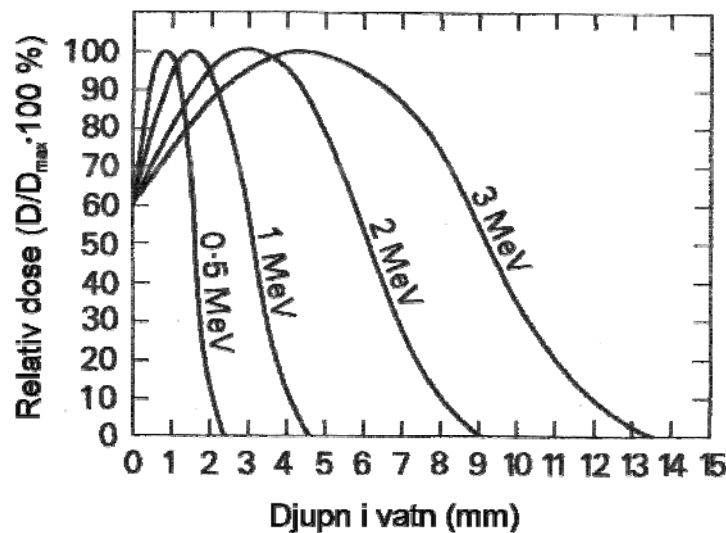
Strålingstype	LET (keV/ μ)
8 MeV γ -stråling	0,2
^{60}Co γ -stråling	0,3
200 keV røntgen	2,5
2 MeV proton	17
27 MeV α -partiklar	25

Rekkjevidde

Rekkjevidda til elektronane er forventningsverdien til veglengda dei tilbakelegg før dei stansar heilt (Attix, 1986). I ei tilnærming der ein går ut i frå at energitapet skjer kontinuerleg, såkalla *continuous slowing down approximation* (CSDA), er rekkjevidda som funksjon av bremseevna gjeven ved:

$$R_{CSDA} = \int_0^{T_0} \left(\frac{dT}{\rho dx} \right)^{-1} dT \quad (2.8)$$

der T_0 er startenergien til elektronet, $\frac{dT}{dx}$ er bremseevna og ρ er tettheten til det materialet elektronane rører seg i. Figur 2.5 viser fordelinga av dose som funksjon av djupn i vatn for ulike elektronenergiar. Vi ser at rekkjevidda aukar med aukande elektronenergi.



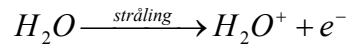
Figur 2.5: Djupn-dosekurve for ulike elektronenergiar i vatn (Swallow, 1973, figuren er modifisert).

Direkte og indirekte effekt av stråling

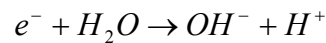
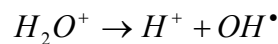
Energiabsorpsjon kan skje enten direkte eller indirekte. Ved direkte effekt vert energien avsett direkte i målmolekylet, enten som ein ionisasjon eller eksitasjon. Ved indirekte effekt vert strålinga absorbert av eit anna molekyl og det vert produsert frie radikalar som kan diffundere over store avstandar for så å indusere skader i målmolekylet. Sidan biologisk materiale består

av 70 – 90 % vatn, er strålingskjemien til vatn svært viktig. I celler dominerer indirekte effekt, DNA vert skadd av frie radikal danna gjennom vekselverkad mellom strålinga og andre atom eller molekyl, spesielt vassmolekyl (Nias, 1998).

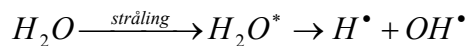
Når vatn vert bestrålt, kan vassmolekyla ioniserast:



Desse iona kan så reagere med vassmolekyl og danne vassradikal:



Vassmolekyla kan også bli eksitert og gå direkte over til vassradikal:



Frie elektron kan polarisere vassmolekyl og bli stabilisert ved at vassmolekyla snur den positive enden av dipolen mot elektrona og dannar ein ringstruktur. Slike elektron vert kalla hydratiserte elektron e_{aq}^- . Dei kan diffundere over store avstandar og indusere skader i biomolekyl (Dertinger og Jung, 1970).

2.3 Strålingsbiologi

2.3.1 Cellulære strålingseffektar

Alle bestanddelane i cella kan skadast av ioniserande stråling, men DNA reknast for å vere det kritiske målområdet (Straume og Carsten, 1993 og Hall, 2000). DNA-skader oppstår heile tida av ulike årsaker, ein føresetnad for alt liv er difor at mesteparten av skadane vert reparert. Ioniserande stråling produserer primært to typar skadar; enkeltrådbrot (SSB, *single-strand break*) der den eine tråden i DNA-spiralen vert broten, og dobbeltrådbrot (DSB, *double-strand break*) der det vert brot i begge trådane. Ein tredje skade som induserast av blant anna UV-stråling, er basefeil. Ved ein basefeil oppstår unormale bindingar mellom to basar i DNA og dette fører til ein mutasjon dersom bindinga ikkje vert reparert (Alberts *et al.*, 2002). Av desse skadane, er sannsynlegvis dobbeltrådbrot den farlegaste (Rothkamm *et al.*, 2003). DSB

dannast ved at begge trådane i DNA-spiralen vert brotne nært nok til at hydrogenbindingane mellom basepara ikkje klarer å halde dei to trådane saman (Jackson, 2002).

I celler med normal reparasjonsmekanisme vert enkeltrådbrot og basefeil raskt reparert og desse skadane har difor lite å seie for celleoverlevinga, mutagenese og genomisk instabilitet (Marples, 2004). Dobbeltrådbrot er vanskelegare å reparere fordi ein ikkje har ein intakt templattråd å kopiere. Det finst to ulike måtar å reparere DSB på; ikkje-homolog endeskøyting (*nonhomologous end-joining*, NHEJ) og homolog rekombinasjon (*homologous recombination*, HR). Ved NHEJ vert dei lause endane i DNA limde saman, utan at eventuelle tapte basar vert erstatta. Dette fører til mykje feilreparasjon og er ei nødløysing som opptrer mykje i mammalske celler. HR er ein meir effektiv reparasjonsmekanisme der det uskadde systerkromatidet vert brukt som templattråd. Sidan ein treng to av kvart kromatid, kan denne reparasjonen berre skje etter S-fasen i cellesyklus (Alberts *et al.*, 2002).

Cellulære stråleskader delast inn i tre kategoriar; letale skader, subletale skader og potensielt letale skader. Letale skader er irreversible og kan ikkje reparerast. Letale skader fører per definisjon alltid til celledød. Subletale skader kan under normale tilhøve verte reparert i løpet av få timar og er i seg sjølve ikkje dødelege for cella. To eller fleire slike skader nært i tid og rom kan likevel samverke og danne ein letal skade. Reparasjon av subletale skader reknast som forklaringa på den auka celleoverlevinga som observerast dersom ein stråledose vert gjeven i to fraksjonar åtskilde i tid. Potensielt letale skader vil under normale tilhøve føre til celledød, men dersom vekstvilkåra etter bestråling ikkje er optimale, kan skadane likevel reparerast (Hall, 2000). Ei forseinking i cellesyklus kan også gje cellene tid til denne tidkrevjande reparasjonen, anten ved at p53 held cella tilbake i G₁k eller at stråleinduserte enzym stoppar cella i G₂ (Alberts *et al.*, 2002).

Variasjon i strålefølsemd gjennom cellesyklus

Strålefølsemda til celler varierer gjennom cellesyklus. Generelt er celler mest strålefølsame i G₂- og M-fase, medan dei er mest stråleresistente i sein S-fase. Celler med lang cellesyklustid og dermed lang G₁-fase, er stråleresistente tidleg i G₁ og følsemda aukar utover mot slutten av fasen (Hall, 2000).

Hypoksi

Strålefølsemda til celler er også avhengig av tilgangen til oksygen. Dersom oksygenkonsentrasjonen rundt ei celle vert for lav, vert cella hypoksisk. Hypoksiske celler er meir stråleresistente enn celler som har tilstrekkeleg tilgang på oksygen (Åmellem, 1997, Hall, 2000). Ved bestråling med låg-LET-stråling er celler under anaerobe tilhøve omlag 2,5

gonger meir stråleresistente enn celler under aerobe tilhøve (Hall, 2000). Hypoksi finst blant anna i tumorar på grunn av for dårleg utvikla kapillærnett.

Celledød

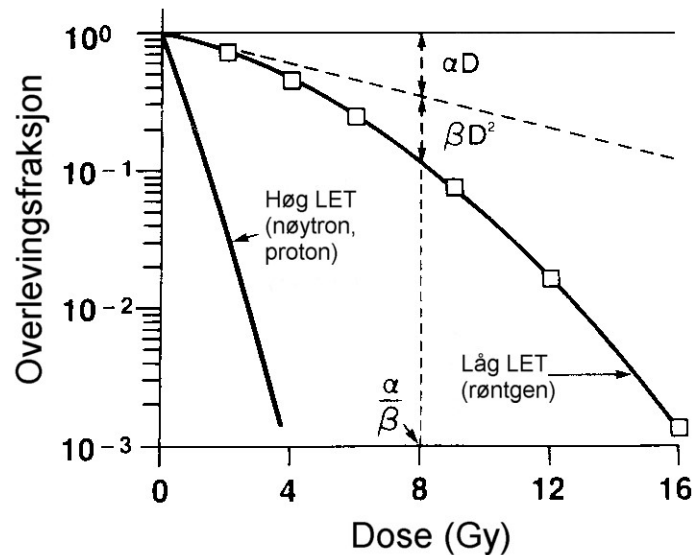
Den vanlegaste forma for celledød etter stråling er mitotisk død. Cella døyr når ho forsøker å dele seg med skadd DNA. Ho sveller opp og sprekk i ein prosess kalla nekrose. Dette resulterer i at innhaldet i cella vert spreidd blant nabocellene. I vev fører mitotisk død til ein inflammatorisk reaksjon (Hall, 2000 og Alberts *et al.*, 2002).

Ein annan form for celledød er såkalla programmert celledød, apoptose. Cella gjennomgår ei rekkje morfologiske endringar i denne prosessen. Ho sluttar å kommunisere med nabocellene, trekkjer seg saman til ei kule og lausnar frå nabocellene. Cella delast så opp i mindre delar, alle heldt saman av ein membran, slik at cellerestane ikkje lek ut i omgjevnadane. Desse celledelane vert så ete opp, fagocyttert, av nabocellene. Denne versjonen av celledød er meir fordelaktig for organismen, fordi det ikkje fører til ein betennelsesreaksjon. Apoptose skjer i stor grad blant celler som ikkje er skada, men som er overflødige (Alberts *et al.*, 2002). Apoptose etter bestråling ser ut til å vere ein p53-avhengig prosess (Hall, 2000).

Celler som har mista evna til å proliferere, kan fortsette å vekse ei stund utan å prøve å dele seg. Cellene vert då svært store og kallast kjempeceller (Nias, 1998).

2.3.2 Celleoverlevingskurver

Ei celleoverlevingskurve viser samanhengen mellom ein stråledose og fraksjonen av celler som har overlevd denne dosen. Med å overleve meinast det at cella har behaldt evna til å dele seg og dermed danne koloni etter bestråling. Ei celle som ikkje lenger har ei slik klonogen evne, reknast som død (Hall, 2000). Celleoverlevingskurver framstillast i eit halvlogaritmisk diagram med dose langs ein lineær x-akse og overlevingsfraksjonen langs ein logaritmisk y-akse (figur 2.6). For høg-LET stråling er overlevingskurva i eit slikt diagram tilnærma ei rett linje, som viser at overlevingsfraksjonen er ein eksponensiell funksjon av dosen. For låg-LET stråling er overlevingskurva initielt lineær, følgt av ein skulder, der kurva krummar. Ved høgare dosar rettast kurva ofte ut igjen (Hall, 2000).



Figur 2.6: Celleoverlevingskurve (Hall, 2000, figuren er modifisert).

Overlevingskurvene vert best skildra av LQ-modellen (*linear-quadratic*) (Sinclair, 1966). Ein går ut i frå at det er to komponentar som medverkar til celledød, der den eine komponenten er proporsjonal med stråledosen og den andre er proporsjonal med kvadratet av dosen.

Overlevingsfraksjonen S er gjeven som:

$$S = e^{-\alpha D - \beta D^2} \quad (2.9)$$

der D er dosen og α og β er konstantar. Chadwick og Leenhouts (1973) utleidde denne formelen der dei gjekk ut i frå at DNA er det kritiske molekylet med omsyn på inaktivering av celler og dobbeltrådbrot i DNA er den skaden som fører til inaktivering. Stråling gjev slike skader, men cella kan også reparere desse. Den lineære α -leddet representerer DSB der ein enkelt strålingspartikkel bryt begge DNA-trådane i ei hending, medan det kvadratiske β -leddet representerer hendingar der to partiklar bryt kvar sin tråd nært nok i tid og rom til å skape eit DSB.

2.3.3 Hypersensitivitet og indusert stråleresistens

Ved dosar under 1 Gy har det vist seg at LQ-modellen underestimerar effekten av akutte stråledosar. Cellene viser høg strålefølsemd i doseområdet $\sim 0-0,5$ Gy, følgt av eit doseområde frå 0,5-1 Gy, der effekten av strålinga per doseining er mindre. Desse fenomena kallast hypersensitivitet og indusert stråleresistens (Joiner *et al.*, 2001). Tidlegare forskning har vist ein samanheng mellom hypersensitivitet og aktiveringa av eit kontrollpunkt i G_2 -fasen av

cellesyklus. Dette kontrollpunktet er doseavhengig og aktiverast ikkje ved låge stråledosar. Hypersensitivitet kan derfor vere konsekvensen av at celler med får passere G₂ og går inn i mitose med stråleskader (Marples *et al.*, 2003). Indusert stråleresistens skjer som følge av at reparasjonsmekanismer i cellene vert aktivert ettersom dosen aukar. Hypersensitivitet ved låge stråledosar kan reduserast eller opphevast ved at cellene vert gjevne ein liten stråledose, såkalla primingdose ei viss tid før effektdosen (Marples og Joiner, 1995).

2.3.4 Bystandereffekt og genomisk instabilitet

Forsking viser at det kan oppstå skader i celler som ikkje sjølv har vorte treffe av ioniserande stråling, verken direkte eller indirekte. Desse skadene kjem av kommunikasjon mellom celler eller at stråleskader kjem til uttrykk i dotterceller, lenge etter at bestrålinga har skjedd. Desse effektane kallast bystandereffekt og genomisk instabilitet (Morgan, 2002). Det har blitt vist at ubestrålte celler viser ei lågare celleoverleving når dei vert dyrka i medium frå både bestrålte kulturar (Mothersill og Seymour, 1997) og i medium frå kulturar med avkom av bestrålte celler (Lyng *et al.*, 2002).

2.3.5 Bestråling med låg doserate

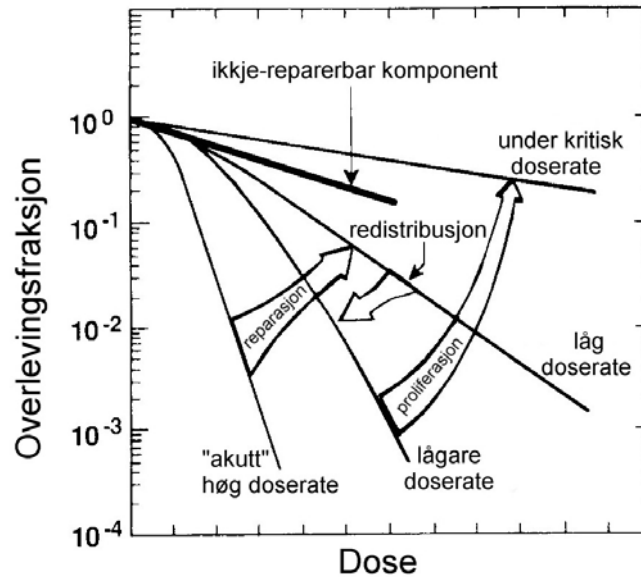
Ved bestråling er doseraten ein av dei viktigaste faktorane som avgjer den biologiske effekten ein gjeven totaldose vil gje. Ein senka doserate og følgjeleg ei lenger bestrålingstid, vil generelt redusere den biologiske effekten av denne totaldosen. Denne doserateeffekten kjem av at den forlengta bestrålingstida gjev cellene betre tid til å reparere subletale stråleskader og er mest uttalt mellom 0,01 og 1 Gy/min (Hall, 2000).

Ved akuttbestråling med høg doserate vil overlevingskurva vise ein signifikant initiell skulder. Ettersom doseraten senkast og bestrålingstida vert lengre, vil cella kunne reparere meir av dei subletale skadane. Overlevingskurva vil difor verte slakare og få ein mindre skulder. Når ein senkar doseraten vidare, vil ein etter kvart nå eit punkt der alle dei subletale skadane vert reparert og overlevingskurva representerer då berre dei skadane som ikkje kan reparerast under normale tilhøve (Hall, 2000).

I enkelte celletypar har ein observert ein invers doserateeffekt, der ei vidare senking av doseraten fører til ei nedsett overleving. Det er usikkert kva som skuldast denne inverse doserateeffekten, det ser ut til å variere frå celletype til celletype. Det er vist at den inverse doserateeffekten kan kome av ein akkumulasjon av celler i den strålefølsame cellesyklusfasen G₂ (Mitchell *et al.*, 1979, Marin *et al.*, 1991, Furre *et al.*, 1999), men effekten har også blitt

vist i celler som ikkje viser nokon form for avvik i cellesyklus (DeWeese *et al.*, 1998, Mitchell *et al.*, 2002).

Ved ein doserate som er låg nok til at cellene kan passere kontrollpunktet G₂k og dele seg, vil celleproliferasjon føre til ei auke i celleoverlevinga og denne repopulasjonen vil etterkvart balansere celledøden. Figur 2.7 oppsummerar doserateeffekten.



Figur 2.7: Doserateeffekten. Figuren viser dosen langs lineær x-akse og relativ celleoverleving langs logaritmisk y-akse. (Hall, 2000, figuren er modifisert).

2.4 Dosimetri

2.4.1 Generelle omgrep

Det følgjande er basert på Attix, 1986.

Absorbert dose er eit mål på dei biologiske signifikante effektane av ioniserande stråling.

Absorbert dose definerast ved hjelp av den stokastiske storleiken avsett energi, ε (ICRU, 1980). Energien som vert avsett frå ioniserande stråling til materie med masse m og volum V er definert som:

$$\varepsilon = (R_{inn})_u - (R_{ut})_u + (R_{inn})_l - (R_{ut})_l + \sum Q \quad (2.10)$$

der $(R_{inn})_u$ og $(R_{inn})_l$ er strålingsenergien til høvesvis uladde og ladde partiklar som kjem inn i volumet V medan $(R_{ut})_u$ og $(R_{ut})_l$ er strålingsenergien til høvesvis uladde og ladde partiklar

som forlèt volumet V . $\sum Q$ er netto energi utleda frå kvilemasse i V . Den absorberte dosen i eit punkt P i V kan definerast som:

$$D = \frac{d\varepsilon}{dm} \quad (2.11)$$

der dm er massen i det infinitesimale volumet dv og $d\varepsilon$ er forventingsverdien av den avsette energien i dv . Den absorberte dosen D er altså forventningsverdien av den avsette energien per masseining i eit punkt P . Eininga for absorbert dose er *gray* (Gy) og er definert som 1 Gy = 1 J/kg. Den absorberte doseraten i eit punkt P ved tida t er gjeven som:

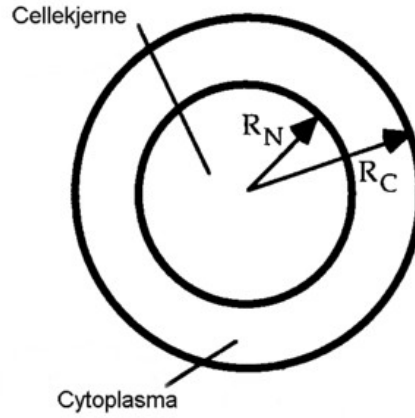
$$\dot{D} = \frac{dD}{dt} = \frac{d}{dt} \left(\frac{d\varepsilon}{dm} \right) \quad (2.12)$$

2.4.2 Ein modell for cellulær tritiumdosimetri

Dosimetrien for inkorporert tritium er utleia av Åste Søvik (2002).

Dosimetrien for cellulære system vert komplisert av mangelen på homogenitet i oppbygginga og tettleiken til cella, og i fordelinga av dei radioaktive molekyla i cella. Det kritiske målområdet i ei celle er DNA (sjå kap. 2.3.1), men tritiummolekyl vil også vere inkorporerte i cytoplasma. Dermed kan både elektron med opphav i cellekjernen og i cytoplasma bidra til dosen avsett i kjernen, men desse elektronen kan også avsetje energien sin utanfor cellekjernen eller cella. Den inhomogene fordelinga av radioaktivitet mellom cellekjernen og resten av cella, vil føre til at meir energi transporterast ut av volumet med høgast aktivitet enn det som tilførast området med lågare aktivitet. Dessutan vil elektronen verte avbøygde ved inelastisk spreiding og bremseevna vil variere ettersom elektronen bremsast ned og taper energi.

Modellen for cellulær dosimetri er henta frå Goddu *et al.* (1997). Denne modellen har som føremål å vere eit reiskap for å estimere absorbert dose på cellulært nivå frå eit utval av intracellulært lokaliserte radionuklidar, deriblant tritium. Reiskapen er i form av cellulære S-verdiar (absorbert dose pr. eining kumulert aktivitet), som gjer det enkelt å kalkulere *self-absorbed-doses* for celler under føresetnaden at dei biologiske data (biokinetikk og subcellulær fordeling av radionuklidene) er tilgjengelege. Den cellulære modellen består av to konsentriske kuler med radius R_N som representerer cellekjernen og R_C som er for heile cella (figur 2.8). Den cellulære radioaktiviteten reknast å vere homogent distribuert innan cytoplasma og innan cellekjernen.



Figur 2.8: Cellulær modell som består av to konsentriske kuler som representerer sjølve cella sitt cytoplasma og cellekjernen. Cella og cellekjernen sine radier er høvesvis R_C og R_N . (Goddu et al. 1997, figuren er modifisert).

Den gjennomsnittlege absorberte doseraten til ein målregion r_k frå ein kjelderegion r_h er definert som:

$$\dot{D}(r_k \leftarrow r_h) = A_h S(r_k \leftarrow r_h) \quad (2.13)$$

der A_h er den kumulerte aktiviteten i kjelderegionen r_h og S -verdien er dosen til målregionen r_k per eining kumulert aktivitet i kjelderegionen r_h . S -verdien er definert som:

$$S(r_k \leftarrow r_h) = \sum_i \frac{\Delta_i \phi_i(r_k \leftarrow r_h)}{m_k} \quad (2.14)$$

der m_k er massen til målregionen, Δ_i er gjennomsnittleg energi emittert per kjerneovergang og den absorberte fraksjonen $\phi_i(r_k \leftarrow r_h)$ er fraksjonen av energien emittert frå kjelderegionen r_h som absorberast i målregionen r_k . Den absorberte fraksjonen $\phi_i(r_k \leftarrow r_h)$ for partikkelstråling er gjeven som:

$$\phi_i(r_k \leftarrow r_h) = \int_0^\infty \psi_{r_k \leftarrow r_h}(x) \frac{1}{E} \left(\frac{dE}{dX} \right)_{X(E)-x} dx \quad (2.15)$$

der E er den initielle energien til det emitterte elektronet, $\psi_{r_k \leftarrow r_h}(x)$ er den geometriske reduksjonsfaktoren og $\left(\frac{dE}{dX} \right)_{X(E)-x}$ er bremseevna evaluert i $X(E)-x$, restrekkevidda til

elektronet etter at det har tilbakelagt ein distanse x i mediet. Den geometriske reduksjonsfaktoren $\psi_{r_k \leftarrow r_h}(x)$ er det gjennomsnittlege sannsynet for at ein vilkårleg vektor med lengde x som har vilkårleg startpunkt innan kjelderegionen r_h endar innan målregionen r_k . Verdien av reduksjonsfaktoren er avhengig av lengda på vektoren x og geometrien og dimensjonane for kjelde- og målregionane. Dei geometriske reduksjonsfaktorane som funksjon av variabelen x og R_C og R_N er gjevne i appendiks A.

Som nemnt, vil bremseevna til elektrona ikkje vere konstant, men avhenge av strekninga elektronet har tilbakelagt. Samanhengen mellom elektronenergi og rekkjevidde som er brukt i berekninga av dei cellulære S-verdiane er også gjevne i appendiks A (Goddu *et al.*, 1997).

Dei cellulære S-verdiane for celler med inkorporert tritium, berekna av Goddu *et al.* (1997) er gjevne i appendiks B.

Den gjennomsnittlege doseraten til cellekjernen vert dermed:

$$\dot{D}_N = A_C [f_N S(N \leftarrow N) + f_{Cy} S(N \leftarrow Cy)] \quad (2.16)$$

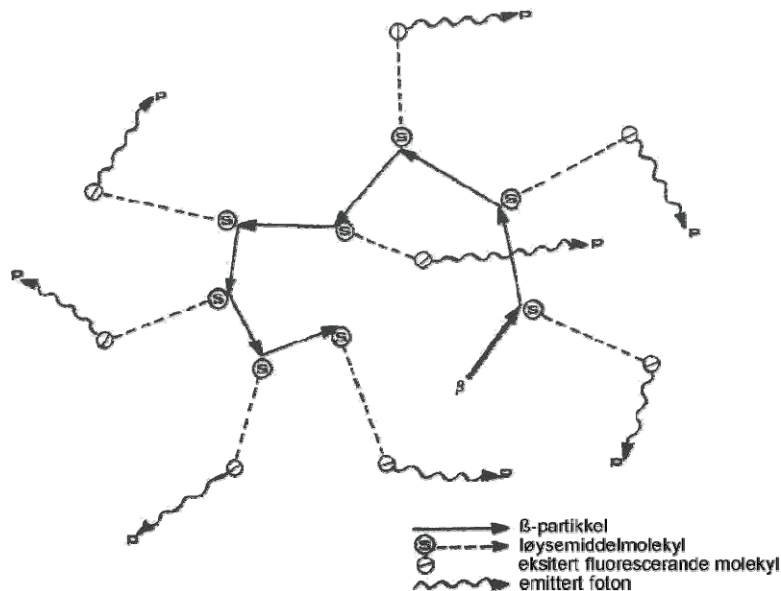
der A_C er den intracellulære aktiviteten, $S(N \leftarrow N)$ er dosen til cellekjernen per eining aktivitet i cellekjernen, $S(N \leftarrow Cy)$ er dosen til cellekjernen per eining aktivitet i cytoplasma og f_N og f_{Cy} er fraksjonen av den intracellulære aktiviteten i høvesvis kjernen og cytoplasma. Eit tredje ledd som representerer den cellulære aktiviteten i celleoverflata (CS) er ikkje nytta, ein går ut i frå at produktet $f_{CS} S(N \leftarrow CS)$ ikkje vil gje eit signifikant bidrag til totaldosen, ettersom ein går ut i frå at både aktiviteten i celleoverflata, f_{CS} og S-verdien er små i høve til bidraga frå aktiviteten i cellekjernen og cytoplasma. Gjennomsnittleg absorbert totaldose til cellekjernen vert då:

$$D_N = \tilde{A}_C [f_N S(N \leftarrow N) + f_{Cy} S(N \leftarrow Cy)] \quad (2.17)$$

der \tilde{A}_C er integrert aktivitet (det vil seie aktivitet integrert over bestrålingsperioden, altså talet på desintegrasjonar som har skjedd i løpet av bestrålinga) og dei andre faktorane er dei same som i likning 2.16.

2.5 Væskescintillasjonsteljing av β -emittarar

Væskescintillasjonsteljing er ein metode som brukast til å detektere og kvantifisere radioaktivitet. Teknikken er basert på at den kinetiske energien til β -partiklane gjerast om til energi i form av foton, som kan detekterast ved hjelp av fotomultiplikatorrøyr og omdannast til ein elektrisk puls. β -partiklane frå det radioaktive prøvematerialet løysast i ei scintillasjonsvæske (Emulsifier-Safe) som består av eit løysemiddel og eit eller fleire fluorescerande stoff, i vårt tilfelle PPO og bis-MSB. β -partiklane reagerer med molekyla i løysemiddelet og ekisterer desse. Desse molekyla reagerer igjen med dei fluorescerande molekyla og eksiterer dei. Når desse deeksiterer, sender dei ut eit foton. Ein enkelt β -partikkel vil dermed gje opphav til mange foton, som til saman utgjer ein scintillasjon. Denne prosessen er illustrert i figur 2.9.

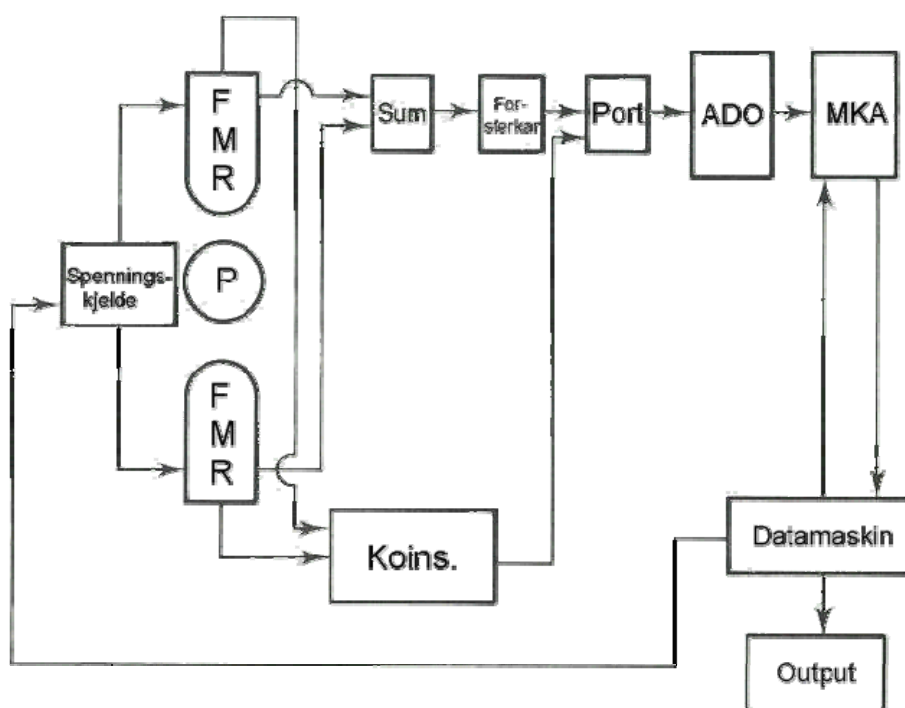


Figur 2.9: Kollisjonsprosessen ved scintillasjonsteljing (Packard Instrument Company, 1995, figuren er modifisert).

Eit skjematisk diagram av ein væskescintillasjonsteljar er vist i figur 2.10. Prøva (P) plasserast mellom to fotomultiplikatorrøyr (FMR) i scintillasjonsteljaren og fotona frå deeksitasjonen til dei fluorescerande molekyla vert absorbert av dei lysfølsame overflatene på røyra, fotokatodane. Fotokatodane emitterer då fotoelektron, som akselererast trinnvist over ein serie elektroder kalla dynoder. Kvar dynode har eit større positivt potensial enn den førre og for kvar kollisjon mellom elektron og dynode, vert det produsert fleire elektron. Denne signalforsterkinga er lineær, slik at den endelege elektronpulsen er proporsjonal med den

primære fotonintensiteten. Pulsane frå kvart FMR vert summert i ein summasjonskrins (Sum) og midla for å gje ein gjennomsnittleg puls. Signala vert så forsterka. Pulsane frå fotomultiplikatorrøyra sendast også til ein koinsidenskrins (Koins.) som avgjer om dei to pulsane oppstod samtidig (innanfor eit tidsrom på 20 ns). Dersom koinsidenskravet er oppfylt, sender krinsen eit opningssignal til porten og signalet kan passere denne. Ein omformar (ADO) konverterer det analoge signalet til eit digitalt signal. Signalet vert så lagra i ein multikanalanalysator (MKA) og kan analyserast vidare med hjelp av ei datamaskin (L'Annunziata, 1987).

Det er fleire faktorar som påverkar sensitiviteten til scintillasjonsteljaren. Kravet om koinsidens for pulsane frå fotomultiplikatorrøyra set ei nedre grense for dei elektronenergiane som kan detekterast, sidan β -partikkelen må ha nok energi til å produsere minst to foton og kvart foton må vekselve med kvart sitt FMR. Fotokatodane i røyra er i tillegg ikkje 100 % effektive med omsyn på omdanninga av foton til elektron, dette bidreg òg til den nedre grensa for dei elektronenergiane som kan detekterast, sidan lågenergetiske hendingar ikkje vil produsere nok foton til at dei vert registrert av fotomultiplikatorrøyra. Teljeresultatet vert også påverka av den radioaktive bakgrunnsstrålinga i rommet der teljaren er plassert, i tillegg til at mange faktorar kan påverke om den opphavslege energien til β -partikkelen når fram til fotomultiplikatorrøyrret i form av foton eller ikkje. Programvare i scintillasjonsteljaren kan korrigere for desse effektane for ei kjend nuklide. Teljaren bereknar aktiviteten til prøva, altså talet på desintegrasjonar i prøva per tidseining, i tillegg til å oppgje talet på registrerte teljingar i same tidsrom (brukarmanual for modell 2100TR, Packard Instruments). Scintillasjonsteljingane i dette arbeidet vart utført med ein Tri-Carb® 2100TR væskescintillasjonsteljar (Packard Instruments, Laborel, Oslo).



Figur 2.10: Skjematisk diagram av væskescintillasjonsteljar (L'Annunziata, 1987, figuren er modifisert).

3 Material og metodar

3.1 Cellelinjer

Ei etablert cellelinje er ein cellepopulasjon som har gjennomgått ei genetisk endring (transformasjon) og som dermed er i stand til å dele seg i det uendelege i kultur (Alberts *et al.*, 2002). Celler frå to humane cellelinjer vart brukt i denne oppgåva:

T-47D-cellelinja vart etablert i 1974 frå celler henta ut frå blodutreiingar på brysthinna til ei kvinne med brystkarsinom (Keydar *et al.*, 1979). Cellene har epitelmorfologi og dannar monolag i kultur. Immunohistologiske studium stadfestar at cellene er frå brystkjertelepitel. T-47D-cellene har normal Rb-funksjon (Åmellem *et al.*, 1998, Stokke *et al.*, 1993), dei har eit mutert p53-gen og manglar normal p53-funksjon (Casey *et al.*, 1991). Ved gunstige vekstvilkår veks T-47D-cellene eksponensielt, med ei median doblingstid som er målt til $37,2 \pm 2$ timar (Stokke *et al.*, 1993). T-47D-cellene viser hypersensitivitet og induisert stråleresistens for dosar under 1 Gy (Jeppesen Edin, 2003).

Cellelinja **NHIK 3025** vart etablert frå eit cervixkarsinom (livmorhalskreft) *in situ* ved Det Norske Radiumhospital i 1967 (Oftebro og Nordbye, 1969). Desse cellene har integrert humant papilloma virus 18 (HPV18). Dette viruset produserer to protein E6 og E7 som bind seg til og inaktiverer tumorsupressorproteina p53 og pRb. Cellene uttrykkjer derfor ikkje funksjonell p53 eller pRb (Åmellem *et al.*, 1998). Den mediane doblingstida er målt til 22 timar (Furre *et al.*, 1999). NHIK 3025-cellene viser ikkje hypersensitivitet og induisert stråleresistens for små stråledosar (Jeppesen Edin, 2003).

3.2 Celledyrking

Arbeidet i denne oppgåva vart utført på celledlaboratoriet ved gruppa for biofysikk, Fysisk institutt, Universitetet i Oslo.

3.2.1 Utstyr

Sterilitet er ein viktig føresetnad for celledyrking. Mikroorganismar som bakteriar, virus, sopp og mycoplasma deler seg omtrent 50 gongar raskare enn humane celler og vil derfor raskt vekse over ein cellekultur (Kielberg *et al.*, 2001). I arbeidet på celledlaboratoriet vart det derfor nytta faste rutinar som skulle sikre sterile vilkår. Alt utstyr og alle kjemikaliar vart sterilisert før bruk. Arbeid som innebar at cellene eller løysingar som skulle komme i kontakt med cellene, vart eksponert for luft, vart utført i ein LAF-benk (LAF = Laminar Flow). I ein LAF-

benk filtrerast lufta gjennom eit HEPA-filter som fangar opp dei fleste partiklane, inkludert bakteriar, slik at lufta i LAF-benken vert steril (Kielberg *et al.*, 2001). Før og etter bruk vart benken desinfisert med 70 % etanol. Tre ulike LAF-benkar vart brukt i denne oppgåva (OAS LAF VB 2040, Simonsen AS, Oslo; Gelair LAF CLASS 100, Solberg og Andersen AS, Noreg og KR-105 SAFETY, Kojair, Finland).

I arbeidet med cellene vart det nytta sterile eingongspipettar av plast (Bibby Sterilin Ltd., England) som vart kasta etter bruk. Alt anna utstyr vart vaska og sterilisert på laboratoriet. Glasutstyr og korkar låg i såpevatn (Decon 90, Decon Laboratories Limited, England) i minst 24 timar og vart deretter skylt i springen eller i oppvaskmaskin. Flasker vart i tillegg skylt fire gongar med Milli-Ro-vatn. Glas- og metallutstyr vart pakka i dobbelt lag aluminiumsfolie og tørrsterilisert i ein varmeomn (Termaks, Bergen) ved 180 °C i om lag to timar. Gummiutstyr og tøy vart forseгла i autoklavposar av papir og autoklavert (Webco) ved 120 °C i 20 minutt. Gummikorkar og opningar på flasker og røyr vart brent av i ein etanol- eller propanflamme (Fireboy eco, Integra Bioscience, Sveits) like før bruk.

T-47D-cellene vart dyrka i NaHCO₃-bufra RPMI 1640 vekstmedium tilsatt 10 % føtalt kalveserum, 1 % penicillin (5000 IU/ml), 1 % streptomycin (5000 µg/ml), 1 % L-glutamin og 0,2 % insulin. NHIK 3025-cellene vart dyrka i NaHCO₃-bufra MEM (Eagle's minimal essential medium) tilsatt 15 % føtalt kalveserum, 2 % penicillin/streptomycin og 1 % L-glutamin. Mediet inneheld alle næringsstoffa, vitaminene og uorganiske salta cellene treng, medan kalveserum og insulin tilfører vekstfaktorar som er nødvendig for celleproliferasjon. Penicillin og streptomycin er antibiotika som skal hindre bakterievekst i mediet. Aminosyra L-glutamin brytast raskt ned og ny L-glutamin vart derfor tilsett mediet kvar veke. Celler dyrkast optimalt ved pH 7,2 – 7,5 (Kielberg *et al.*, 2001) og for å ha kontroll med pH-verdien vart derfor pH-indikatoren fenolraudt tilsett. Fenolraudt skiftar farge ved pH = 7,4.

Trypsin er eit proteolytisk enzym som spaltar proteinbindingane mellom naboceller og mellom cellene og underlaget dei er festa på. Når celler trypsinerast, trekkjer dei seg saman og vert kuleforma. Trypsinen som vart brukt på T-47D-cellene var tilsett EDTA som forsterkar verknaden av trypsinen ved å binde Ca²⁺-ion som dei intracellulære bindingane mellom cellene er avhengige av. NHIK 3025-cellene toler ikkje like mykje som T-47D-cellene og det vart brukt trypsin utan EDTA på desse cellene.

Cellene vart dyrka i sterile kulturflasker eller kulturskåler av plast (Nuclon, Danmark).

3.2.2 Omsetjing

Celler treng regelbunden tilførsel av næringsstoff og vekstfaktorar for å oppretthalde jamn vekst. Avfallsstoff som cellene produserer må òg fjernast og celletettleiken må regulerast, då både for høg eller låg celletettleik kan hemme celleveksten. For å sikre optimale veksttilhøve vart cellene sett om to gonger i veka, kvar måndag og fredag, i tillegg til at dei fekk tilført ferskt medium kvar onsdag.

Ved omsetjing vart det gamle mediet fjerna og cellene skylde med trypsin (ein gong for T-47D-celler, to gongar for NHIK 3025-celler) før ny trypsin (3 ml i 25 cm² flaske, 5 ml i 80 cm² flaske) vart tilsett. Cellesuspensjonen vart deretter pumpa forsiktig med ei 2 ml pipette for å løyse cellene frå kvarandre til ein hadde ein suspensjon med mest mogeleg enkeltceller. Dette vart kontrollert i mikroskop (Nikon TMS, Japan). Cellesuspensjonen vart så overført til eit reagensrøyr med like stor mengde medium som trypsin. Mediet stansa då verknaden av trypsinen ved at denne batt seg til serumproteina i mediet. Cellene vart sentrifugert ved 1100 rpm i 5 min og medium/trypsinblandinga fjerna før cellene vart resuspondert i friskt medium. Ei passande mengd av cellesuspensjonen vart overført til ei eller fleire flasker med ferskt medium (5 ml i 25 cm² flaske, 15 ml i 80 cm² flaske). For å oppnå optimal pH vart det blåst inn luft med 5 % CO₂ (8 sekund for 25 cm² flaske, 12 sekund for 80 cm² flaske). Celleflaskene vart forseгла og sett i eit inkubatorskap (National Heinicke Company) som heldt 37 °C.

I nokon av eksperimenta vart cellene sådd ut i sterile skåler i staden for flasker. Etter at cellene vart sådd ut med 5 ml medium per skål, vart celledskålene plasserte på eit sterilt metallbrett og sett i ein steril CO₂-inkubator (Steri-cult 200 Incubator, Forma Scientific, Houm AS, Oslo) som heldt 37 °C. Ved utsåing av cellene i skåler vart det nytta sterile eingongshanskar og steril frakk for å hindre kontaminering av celledskålene.

Både medium og trypsin som vart brukt i omsetjing, var varma i vassbad til 37 °C for at cellene skulle holde så stabil temperatur som mogeleg.

Frå våren 2004 vart det nytta ein annan metode for omsetjing. Flaskene vart då skylt med trypsin (2 gongar for T-47D-cellene og 3 gongar for NHIK 3025-cellene) og trypsinen fjerna. Fuktigheta som var igjen i flasken etter skyljinga var nok til å løyse cellene. Flaskene vart sett i inkubatorskap i nokre minutt (3-5 minutt for T-47D-celler, 10-15 minutt for NHIK 3025-celler) medan trypsinen fekk verke, før nytt medium vart tilsett og ei passande mengd celler vart overført til ei eller fleire flasker.

Ved mediumskift vart gamalt medium fjerna, nytt tilsett og flaskene *flusha* med CO₂ før dei vart sett tilbake i inkubatorskapet.

3.3 *Bestrålingsoppsett*

3.3.1 *Inkorporering av tritium*

Bestrålingsoppsettet i dette arbeidet er det same som vart brukt av Åste Søvik (2000). Cellene vart bestrålt i kultur ved at ei viss mengd av den radioaktive isotopen [³H] (tritium) vart inkorporert i proteinet til cellene. Dette førte til at ein, medan cellene vart kontinuerlig bestrålt, kunne studere effektane av strålinga, med mykje lengre bestrålingstider og lågare doserate enn ved eksternt levert bestråling. Ved inkorporering av ein radioaktiv nuklide i eit cellulært molekyl, vil ein i tillegg til å introdusere ei strålekjelde i cella, også danne bindingar som kan gje molekylet andre fysiske og kjemiske eigenskapar enn det korresponderande umerka molekylet har. Ein kan og påverke eigenskapane til det cellulære molekylet gjennom ein såkalla transmutasjonseffekt, når den radioaktive nukliden desintegrerer og det vert danna ein kjerne av eit anna grunnstoff. Dei biologiske effektane av inkorporert tritium reknast likevel å skuldast energiavsetjinga av β-strålinga (Hill og Johnson, 1993, Morstin *et al.*, 1993).

Tritium vart inkorporert i proteina til cellene ved hjelp av ein spesifikt merka prekursor, aminosyra valin. Valin er ei essensiell aminosyre for menneske (Alberts *et al.*, 2002) og humane celler i kultur er avhengige av å få tilført denne aminosyra i vekstmediet. Tritiert valin vart derfor tilsatt mediet som cellene voks i, slik at cellene kunne ta opp denne radioaktivt merka aminosyra og bygge den inn i cellulære protein. Det vart nytta same konsentrasjon som den lågaste i Åste Søvik (2000) si oppgåve, med spesifikk aktivitet i media på 1,6 Ci/mol. Den spesifikke konsentrasjonen vart halde konstant ved hjelp av ein høg konsentrasjon av ikkje-radioaktiv (såkalla "kald") valin, 1,0 mM, i mediet (Rønning *et al.*, 1979). Celler i kontrollgruppene, som ikkje vart bestrålt, vart dyrka på medium tilsett 1,0 mM "kald" valin. Berekningar av spesifikk aktivitet og oppskrifter er vist i appendiks E.

3.3.2 *Strålehygiene*

Maksimal rekkjevidde til tritium er 6 μm i biologisk materiale, medan den i vev er < 1 μm (ICRP, 1983). Tritium representerer derfor ingen ekstern strålefare, β-partiklane som vert frigjort er ikkje i stand til å trengje gjennom det ytre laget av døde hudceller (Hill og Johnson, 1993). Sidan tritium derimot kan inkorporerast i biologiske molekyl, må dei strålehygieniske

tiltaka konsentrerast om å hindre at tritierte sambindingar vert tatt opp av personalet som arbeider med dei. I alt arbeidet med løysingar som inneheldt tritiert valin, vart det nytta eingongshanskar av plast. Mediumflaskene som inneheldt tritiert valin vart merka med gul tape med symbolet for radioaktivitet og på celleflasker som inneheldt radioaktivt medium vart dette skrive på flaskene. Når det radioaktive mediet vart blanda, vart arbeidet gjort på trekkpapiir med gummiert underside (Versi-Dry Lab Soakers, Nalgene, USA), slik at eventuelt søl ikkje skulle komme i kontakt med flater der det vart arbeidd utan hanskar. Trekkpapiiret vart kasta etter kvar gongs bruk ilag med det sterile eingongsutstyret som vart nytta. Mengda tritium brukt i forsøka oversteig aldri grensa for kor mykje som kan tømmast ut i det vanlege vatn- og avlaupssystemet per veke, derfor kunne løysingar som inneheldt tritiert valin kastast direkte i vasken og gjenbruksutstyr kunne skyljast i vasken før sterilisering (Søvik, 2000).

3.4 Måling av celle- og kjernestorleik

Det var nødvendig å finne storleiken på cella og cellekjernen for å kunne berekne dosen ved hjelp av modellen for tritiumdosimetri (kap. 2.4.2). Dette vart gjort for ubestrålte celler, vi går ut frå at storleiken ikkje endrast signifikant under bestråling (sjå kap. 5.1.2 for drøfting).

3.4.1 Preparering av cellene

Celler frå ei celleflaske med vekstflateareal på 80 cm² vart trypsinert laus som skildra i kapittel 3.2.2. Trypsinen fekk verke til cellesuspensjonen bestod av flest mogeleg enkeltceller, sidan berre slike celler kan brukast for å finne cellediameteren. Cellesuspensjonen vart overført til eit reagensrøyr som inneheldt like mykje medium som mengda trypsin brukt for å losne cellene. 2 ml av denne suspensjonen vart så overført til eit nytt reagensrøyr og tilsett Hoechst 33342 (562 µg/ml, Riedel de Haën) til endeleg konsentrasjon 2 µg/ml. Hoechst 33342, såkalla vital Hoechst, er eit fluorescerande fargestoff som takast opp av levande celler gjennom ein intakt cellemembran og fargar DNA (Kielberg *et al.*, 2001). Cellene vart sett i inkubatorskap ved 37 °C i om lag 45 minutt for at cellene skulle få tid til å ta opp fargestoffet. Etter dette vart suspensjonen tynna ut til passende cellekonsentrasjon og overført til celleflasker med vekstflateareal på 25 cm².

3.4.2 Mikroskopering og fotografering

Mikroskoperinga og fotograferinga av cellene vart gjort ved hjelp av eit Nikon Diaphot invertert mikroskop (Nikon, Japan) med fluorescens og fasekontrast, motorisert kryssbord (Merzhauser, Tyskland) og digitalkamera (Nikon D70, Japan). Fluorescensbilete vart tatt ved hjelp av ein kvikksølvlampe (Nikon, Japan). Kryssbordet kunne styrast anten frå ei datamaskin eller ein kontrollspak (ITK, Tyskland) og det kommuniserte med desse ved hjelp av ei styringseining (Multicontrol 2000, ITK, Tyskland). Cellene brukar fleire timar på å feste seg til underlaget, så dei beheldt kuleforma under heile mikroskopiproedyren.

Cellekonsentrasjonen var valt slik det var ei relativt stort mengd celler i biletet, samstundes som at cellene i størst mogleg grad låg enkeltvis utan å røre ved kvarandre. Celleflaska med dei DNA-farga cellene vart plassert på kryssbordet og det vart venta ein par minutt, slik at cellene fekk søkke til botnen av flaska. Det vart tatt eit bilete med fasekontrast, som viste heile celler og eit fluorescensbilete av dei same området i celleflaska, der berre kjernen gir signal på grunn av Hoechst-farginga. Kryssbordet vart deretter flytta slik at det ikkje vart overlapp mellom bileta og to nye bilete vart tatt. Alle bileta vart tatt med $20\times$ forstørring på mikroskopet.

3.4.3 Bildebehandling og –analyse

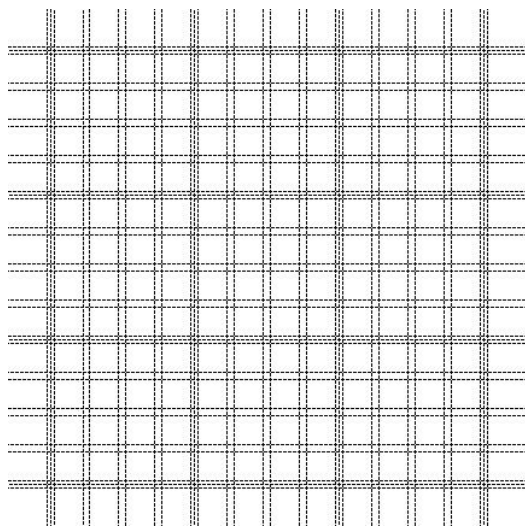
Bildebehandlinga vart gjort med programmet Image Tool (UTHSCSA, USA). Ein rutine i dette programmet kunne skilje cellene i fasekontrastbileta og kjernane i fluorescensbileta frå bakgrunnen og merke desse objekta. Dei merka objekta vart så gjennomgått manuelt og det vart valt ut objekt som representerte kuleforma enkeltceller og deira tilhøyrande kjernar for vidare analyse. Ein annan rutine analyserte så dei utvalde objekta og det vart for kvart bilete laga ei fil der kvart objekt vart karakterisert utifrå ei rekkje parametarar. Desse filene vart så analysert i Excel.

Den parameteren som var av størst interesse for oss, er *feretdiameteren* til objektet. Ein gjekk ut frå at objektet var sirkulært og feretdiameteren d finnast utifrå arealet A , i samnhøve med formelen:

$$d = 2\sqrt{\frac{A}{\pi}} \quad (3.1)$$

Image Tool gav feretdiameteren i eininga pikslar. Då ein ikkje visste omrekningsfaktoren frå pikslar til mikrometer for mikroskopet og kameraet, vart det brukt eit Bürkerkammer for å finne denne. Det vart tatt bilde av Bürkerkammeret under mikroskopet med same forstørring

som av cellene. Areal på det store og det vesle kvadratet på Bürkerkammeret er kjent, høvesvis $0,04 \text{ mm}^2$ og $0,0025 \text{ mm}^2$, som gjev oss sidekantane i kvadrata, $0,20 \text{ mm}$ og $0,05 \text{ mm}$. Vi kunne så finne høvet mellom sidene til Bürkerkammeret på biletet og det reelle Bürkerkammeret, som er omrekningsfaktoren. 1 piksel på bileta tilsvarer $0,617 \mu\text{m}$. Ein modell av Bürkerkammeret er vist i figur 3.1.



Figur 3.1: Modell av Bürkerkammer brukt til å finne omrekningsfaktoren frå pikslar til mikrometer.

Diameterfordelingane til cellene og kjernane vart plotta og gjennomsnittleg diameter for cellene og kjernane vart berekna i Excel, ilag med standardavviket. Gjennomsnittsverdien d_m er gjeven som:

$$d_m = \frac{\sum_{i=1}^n d_i}{n} \quad (3.2)$$

der d_i er diameterane til dei i ulike cellene/kjernane og n er talet på celler/kjerner som vart analysert. Standardfeilen er gjeve som (Squires, 1985):

$$\Delta d_m = \sqrt{\frac{1}{n(n-1)} \sum_{i=1}^n (d_i - d_m)^2} \quad (3.3)$$

3.5 Dosimetrieforsøk

3.5.1 Væskescintillasjonsteljing av β -emittarar

Vi ynskte å kartleggje inkorporeringskinetikken til den tritierte valinen for dei to ulike celletypene for å finne kor lang tid det tok frå start på inkorporeringa til doseraten hadde nådd eit konstant nivå. Vi ville òg kunne berekne denne doseraten og totaldosen ved ei gjeva bestrålingstid. Dette vart gjort ved å finne aktiviteten per celle ved hjelp av væskescintillasjonsteljing. Det vart også gjort scintillasjonsteljingar på det radioaktive mediet, for å kontrollere at den berekna aktiviteten per volumeining var lik den faktiske aktiviteten per volumeining (sjå appendiks E).

Inkorporeringa starta med at cellene vart sådd ut i store flasker (vekstareal på 80 cm²) med radioaktivt medium ein måndag. Det vart i tillegg sådd ut celler med medium med ”kald” valin, desse vart brukt som ein kontroll i scintillasjonsteljingsprosessen. Dagen etter og kvar dag framover vart det tatt ut ei flaske av kvar celletype og cellene i desse flaskene vart preparert til scintillasjonsteljing (sjå kap. 3.5.2). På onsdag vart det skifta medium på dei attverande flaskene og på fredag vart ei stor flaske av kvar celletype omsett for at forsøket skulle kunne halde fram laurdag og veka etter. Det første forsøket strekte seg over elleve dagar og forsøk nr. 2 gjekk over 18 dagar.

For å kunne berekne doseraten og dosen ved hjelp av dosimetrimodellen skildra i kap. 2.4.2, var det nødvendig å finne fordelinga av radioaktivitet mellom cellekjernane og cytoplasma. Desse forsøka vart gjort med celler som hadde vokse på medium med [³H]-valin i over fire veker, slik at aktiviteten i heile cellene hadde nådd eit konstant nivå. Prepareringsprosessen for å få isolert cellekjernane krev gjentekne sentrifugeringar der det er stort sannsyn for å misse kjernar. Det vart derfor nytta store celleflasker også her, for å sikre ein høg nok aktivitet i prøvane ved teljing.

3.5.2 Preparering av celler og kjernar for scintillasjonsteljing

Heile celler

Cellene i den store celleflaska vart trypsinert laus som skildra i kapittel 3.2.2. Etter trypsineringa vart resten av arbeidet utført ved istemperatur eller ved 4 °C. Cellesuspensjonen i trypsin/mediumblandinga vart sentrifugert i kjølesentrifuga ved 4 °C (Labofuge 400R, Heraeus Instrumenst, Houm AS, Oslo) ved 1800 rpm i 5 minutt. Blandinga av trypsin og medium vart fjerna og cellene vaska og sentrifugert på nytt med 3 ml kaldt, fosfatbufra saltvatn (PBS). PBS vart soge av og cellene vart fiksert med 3 ml 10 % perklorsyre (PCA) i

15 minutt. Denne fikseringa fjerna den syreløyslege radioaktiviteten i prøva, medan radioaktiviteten i proteina til cellene vart beholdt. PCA vart fjerna og cellene vart vaska og sentrifugert 3 gonger med 3 ml 2 % PCA. Før den siste sentrifugeringa vart det tatt ut 0,5 ml av celsuspensjonen til teljing i Bürkerkammer (sjå kap. 3.5.3) og dei resterande cellene vart spunne ned. PCA vart soge av og cellene vart tilsett 2 ml 0,4 % natrium deoksyholin (NaDOC) og inkubert ved 37°C i inkubatorskap i 30 minutt. 1 ml av prøva vart så overført til eit teljerøyr med 7 ml scintillasjonsteljevæske og blanda godt ved hjelp av *vortexing*. Det vart tatt to parallelle prøvar til scintillasjonsteljing frå kvar celleflaske. Prøvene vart talt ved hjelp av ein protokoll i scintillasjonsteljaren som er definert av Åste Søvik (2000).

Cellekjernar

Cellene i ei stor celleflaske vart trypsinert laus (sjå kap. 3.2.2). Etter sentrifugering i kjølesentrifuge, 1800 rpm i 5 minutt, vart trypsin/mediumblandinga fjerna og cellene skylt og sentrifugert i 3 ml kald PBS. Som ved prepareringa av heile celler, vart resten av arbeidet utført med løysingane på is og prøva anten på is eller i kjølesentrifuge ved 4°C. Cellene vart så tilsett 2,5 ml Buffer A og fekk stå med dette i 15 minutt (NHIK 3025-cellene) og 30 minutt (T-47D-cellene). Denne bufferen har eit osmotisk trykk som gjer at cellemembranen lyserer, men kjernemembranen held seg intakt, slik at ein får isolert cellekjernane. I resten av prepareringsprosessen vart kjernane spunne ved 800 rpm i 10 minutt. Kjernane vart vaska og sentrifugert med 3 ml PBS. PBS vart fjerna og kjernane vart tilsett 3 ml 10 % PCA og fekk stå i 15 minutt. Dei fikserte cellekjernane vart så vaska tre gongar med 3 ml 2 % PCA. Før den siste sentrifugeringa vart det tatt ut 0,5 ml av cellekjernesuspensjonen til teljing i Bürkerkammer (sjå kap. 3.5.3). Dei resterande kjernane vart spunne ned, tilsett 2 ml NaDOC og inkubert ved 37°C i inkubatorskap i 30 minutt. 1 ml av prøva vart så overført til eit teljerøyr med 7 ml scintillasjonsteljevæske og *vortexa*. Det vart tatt to parallelar til scintillasjonsteljing frå kvar celleflaske. Scintillasjonsteljinga vart utført med same protokoll som for heile celler.

Medium

0,5 ml medium vart blanda med 8 ml scintillasjonsteljevæske i eit teljerøyr. Blandinga vart *vortexa* og talt med same protokoll som for heile celler.

3.5.3 Bestemming av celletal

Teljing i Bürkerkammer

Det vart utført teljingar på suspensjonar av celler og cellekjernar for å finne konsentrasjonen av celler eller kjernar i suspensjonen. Bürkerkammeret (sjå fig. 3.1) består av to separate rutenett, der kvart rutenett er av 3×3 ruter. Talet på celler per rute vart bestemt i minst fem av rutene i kvart rutenett. Gjennomsnittsverdien for talet på celler vart så berekna. Når dekkglas er lagt over kammeret, har kvar rute eit volum på 10^{-4} ml. Ved å multiplisere talet på celler per rute med 10^4 , fekk ein talet på celler per ml i suspensjonen som vart talt på. Ein fordel med å bruke Bürkerkammer er at ein ser cellene og får høve til å vurdere kva ein tel.

3.5.4 Inkorporeringskurver og doseberekning

Inkorporeringskurvene vart plotta med aktiviteten per celle framstilt som funksjon av tida som hadde gått sidan starten av inkorporeringa. Doseraten til cellekjernen vart berekna ut i frå modellen presentert i kap. 2.4.2.

3.6 Bestemming av doblingstider

3.6.1 Behandling av cellene

Doblingstida vart bestemt både for celler som voks på medium med spesifikk aktivitet på 1,6 Ci/mol og for ubestrålte kontrollceller som fekk medium tilsett ”kald” valin. Det vart nytta små celleflasker med vekstareal på 25 cm^2 . Før cellene vart sådd ut i flaskene, vart det ripa inn eit lite rutenett på botnen av flasken. Cellene vart sådd tynt ut og flaskene plassert på eit inkubatorrom. Inkubatorrommet hadde heile tida ein temperatur på 37°C . Cellene fekk stå over natta slik at dei fekk tid til å feste seg og teljingane starta tysdag morgon. Det vart valt ut ei rute på botnen av kvar flaske som inneheldt eit passande tal celler. Desse rutene vart merka av med ein tusj, slik at ein lett kunne finne tilbake til den riktige ruta ved kvar teljing. Det vart teikna kart over kvar enkelt celle eller gruppe av celler si plassering i rutene, som gjorde det mogeleg å følgje talet på celler i kvar posisjon over tid. Dei same cellene vart talde tysdag ettermiddag, onsdag morgon og ettermiddag, torsdag morgon og ettermiddag, samt fredag morgon. Cellene fekk mediumskift etter teljinga onsdag morgon, i pakt med vanleg rutine ved cellelaboratoriet. I dei innleiande forsøka viste det seg at T-47D-cellene hadde ein lågare vekstrate etter mediumskiftet enn før. Dette hende mest sannsynleg på grunn av at cellene var sådd ut svært tynt og etter mediumskiftet var det derfor mangel på vekstfaktorar og hormon som cellene skil ut. Desse stoffa stimulerer celleveksten. I forsøka etter var det derfor berre NHIK 3025-cellene som fekk mediumskift onsdag. Mediumskiftet vart gjort i ein steril LAF-benk på inkubatorrommet.

3.6.2 Berekning av doblingstidene

Celletala ved kvart telletidspunkt vart delt på talet på celler ved starten av teljingane, slik at ein kom fram til talet på celler relativt til talet ved tida $t = 0$. Dei relative celletala vart plotta som funksjon av tida. Ved hjelp av ikkje-lineær regresjon i programmet Origin vart celletala tilpassa formelen $y = ae^{bx}$ og parametrane a og b vart bestemt. Doblingstida kunne då finnast ut i frå:

$$t_2 = \frac{\ln 2}{b} \quad (3.4)$$

Doblingstidforsøka vart gjort fleire gonger for kvar celletype og bestrålingstid, og den endelege doblingstida, $t_{2,m}$ vart berekna utifrå dei vekta doblingstidene til kvart enkeltforsøk som:

$$t_{2,m} = \frac{\sum_{i=1}^k n_i t_{2,i}}{\sum_{i=1}^k n_i} \quad (3.5)$$

der $t_{2,i}$ er doblingstida i forsøk i , n_i er talet på celler ved fyrste teljing i forsøk i og k er talet på forsøk for den gjeldande celletype og bestrålingstid. Uvissa i middelveiden er vekta for kvart enkeltforsøk og er gjeven som:

$$\Delta t_{2,m} = \sqrt{\frac{1}{k-1} \frac{\sum_{i=1}^k n_i (t_{2,i} - t_{2,m})^2}{\sum_{i=1}^k n_i}} \quad (3.6)$$

Faktoren $\frac{1}{k}$, som vektar bidraga frå kvart enkelt forsøk likt, er her erstatta med faktoren

$\frac{n_i}{\sum_{i=1}^k n_i}$, som vektar kvart forsøk etter talet på celler som vart analysert i det gjeldande forsøket.

3.7 Eksperiment for å måle celleoverleving

3.7.1 Behandling av cellene

I disse eksperimenta vart det nytta ei gruppe celler som vart bestrålte kontinuerlig i tillegg til ei kontrollgruppe med celler som voks på medium med ”kald” valin. Inkorporeringa starta med at cellene vart tilført radioaktivt medium ved omsetjing på måndag og radioaktivt medium vart nytta ved mediumskift onsdag og ved omsetjinga fredag. Påfølgande måndag vart cellene sådd ut i plastskåler med medium utan tritiert valin. Cellene vart trypsinert og sentrifugert som beskrive i kap. 3.2.2, men før sentrifugeringa vart ein del av cellesuspensjonen tatt ut til teljing i Bürkerkammer for å finne cellekonsentrasjonen. Etter å ha bestemt celletalet, vart cellesuspensjonen tynna ut med medium til den ynskte konsentrasjonen for utsåing. Det vart sådd ut 5 skåler med 200 celler per skål i tillegg til ei kontrollgruppe på 5 skåler med 200 celler per skål.

Celleskålene vart sett i den sterile CO₂-inkubatoren og cellene fekk vekse og danne koloniar i 14 og 16 dagar for høvesvis NHIK 3052-cellene og T-47D-cellene. I løpet av denne tida vart det skifta medium på skålene etter 7 dagar. Cellene vart fikserte når koloniane var store nok til at dei var godt synlege utan mikroskop. Ved fikseringa vart cellene fyrst skylt med PBS før dei vart fikserte med 96 % etanol i om lag 2 minutt. Koloniane vart så farga med metylenblått i om lag 2 minutt og vaska i lunka vatn. Koloniar som bestod av 40 celler eller meir vart talde med hjelp av ein koloniteljar med ei enkel lupe (Gerber Instruments, Tyskland). I dei tilfella det var vanskeleg å avgjere om kolonien bestod av minst 40 celler eller ikkje, vart det nytta ei stereolupe (Nikon, Japan) eller eit mikroskop (TMS, Nikon, Japan) til å telje alle cellene i kolonien.

3.7.2 Berekning av celleoverleving

Talet på koloniar i kvar skål vart talt og gjennomsnittet N i kvar gruppe vart berekna. Dei fem kontrollskålene med ubestrålte celler gir *plating efficiency*, PE , for cellene. PE brukast til å justere overlevingsfraksjonen til dei bestrålte cellene. PE er gjeven ved:

$$PE = \frac{K}{K_0} \quad (3.7)$$

der K er gjennomsnittleg tal på koloniar per skål i kontrollgruppa og K_0 er talet på celler sådd ut per skål i kontrollgruppa.

Overlevingsfraksjonen for kvar gruppe som har fått same behandling er gjeven ved:

$$F = \frac{N}{N_0 \cdot PE} \quad (3.8)$$

der N_0 er talet på celler sådd ut per skål. Ein sår ut fleire skåler for kvar gruppe og overlevingsfraksjonen bereknast som den gjennomsnittlege overlevingsfraksjonen for desse skålene. Standardavviket av dette gjennomsnittet (standardfeilen) for kvar gruppe er gjeven ved:

$$\Delta N = \sqrt{\frac{1}{n(n-1)} \sum_{i=1}^n (X_i - X_m)^2} \quad (3.9)$$

der n er talet på skåler, X_i er talet på koloniar i skåla i og X_m er gjennomsnittet av talet på koloniar i ei gruppe på 5 skåler. Overlevingsfraksjonen er ein funksjon av dei to variablane K og N . Standardfeilen for overlevingsfraksjonen er gjeven ved:

$$\Delta F = \sqrt{\left(\left(\frac{\partial F}{\partial K} \Delta K \right)^2 + \left(\frac{\partial F}{\partial N} \Delta N \right)^2 \right)} = \sqrt{\left(\left(\frac{-N \cdot K_0}{N_0 \cdot K^2} \Delta K \right)^2 + \left(\frac{K_0}{N_0 K} \Delta N \right)^2 \right)} \quad (3.10)$$

der ΔK er standardfeilen for gjennomsnittleg overlevingsfraksjon i kontrollgruppa og ΔN er standardfeilen for gjennomsnittleg overlevingsfraksjon ved behandling.

3.8 Flowcytometri

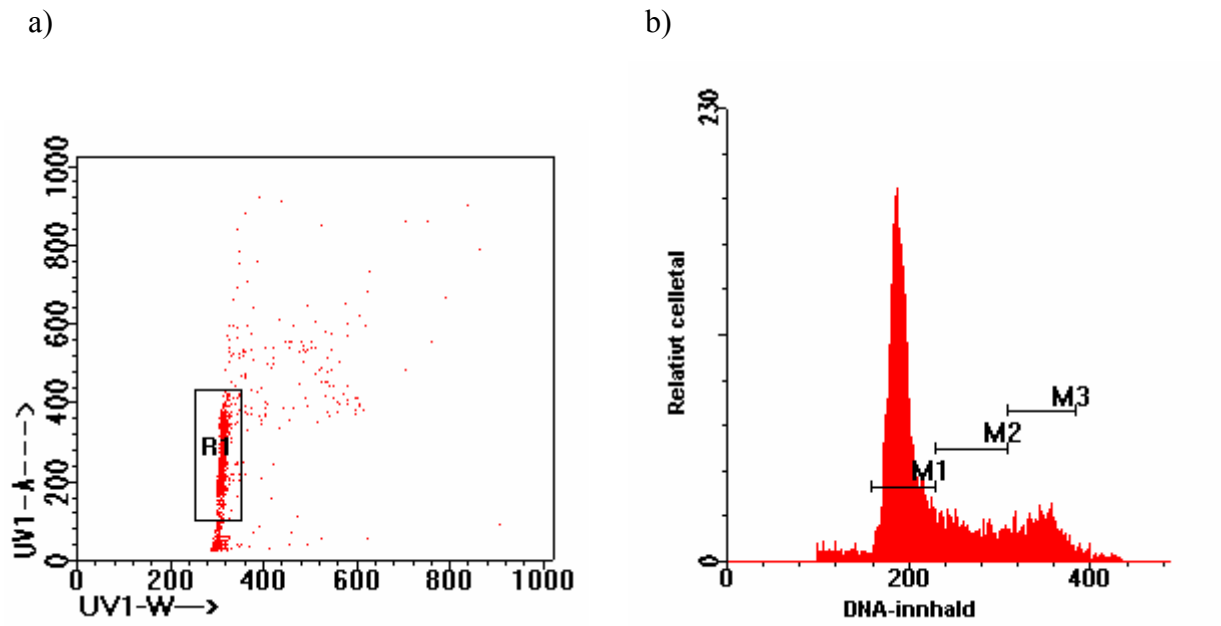
Flowcytometrien i dette arbeidet vart gjort av Pål Graff og vart brukt til å måle mengda DNA i cellene. Når DNA-mengda i kvar celle er kjend, kan vi finne fraksjonen av celle i dei ulike fasane av cellesyklus. Det relative celletalet plottast mot det relative DNA-innhaldet i eit DNA-histogram (fig. 3.2). Målingane vart utført med eit FACStar^{plus} flowcytometer (Becton Dickinson) ved Det norske radiumhospital.

3.8.1 Preparering av cellene

Det vart gjort flowcytometriforsøk med dei bestrålte cellene fleire gongar i løpet av bestrålingsperioden. Det vart i tillegg brukt ubestrålte celle som kontroll. Fredagen før preparering vart det sådd ut ei ekstra celleflaske av kvar cellegruppe til flowcytometri. Cellene vart trypsinert til enkeltceller som skildra i kapittel 3.2.2. Cellene i trypsin/mediumblandinga vart sentrifugert i kjølesentrifuge ved 1800 rpm i 5 minutt. Dei vart så vaska med 5 ml kald PBS. Cellene vart resuspondert i 1 ml PBS og cellesuspensjonen vart overført til 3,5 ml kald metanol. Cellene vart då fikserte og kunne oppbevarast i frysar ved -20 °C i opptil to veker. Før flowcytometrimålingane vart gjennomført, vart cellene igjen vaska i PBS før dei vart tilsett Hoechst 33258 i konsentrasjonen 2 µg/ml for DNA-farging.

3.8.2 Presentasjon av data

Analysen av flowcytometridata vart gjort med dataprogrammet PC-lysys. Alle teljingane leggst inn i eit såkalla *dot plot* med breidda av signalet (UV1-W) langs x-aksen og arealet til signalet (UV1-A) langs y-aksen. Ein vel ut berre dei teljingane som gjeld enkeltceller. På figur 3.2a er cellene innan R1 valde ut til vidare analyse. Punkta som ligg lenger ut på x-aksen reknast for å vere klumpar av to eller fleire celler, så desse takast ikkje med i DNA-histogrammet. Flowcytometeret var stilt inn slik at G₁-cellene skulle liggje rundt 200 på x-aksen, celler som ligg under dette er derfor ikkje tatt med i analysen. Ved å velje UV1-A som x-akse, får ein ut eit histogram som vist i fig. 3.2b. Dei ulike delane av histogrammet representerer ulike delar av cellesyklus. Den fyrste toppen inneheld celler som er i G₁-fase, medan den andre toppen inneheld celler i G₂- og M-fase. Cellene i området mellom dei to toppane er i S-fase. Talet på celler i kvart område vert automatisk rekna ut av PC-lysys.



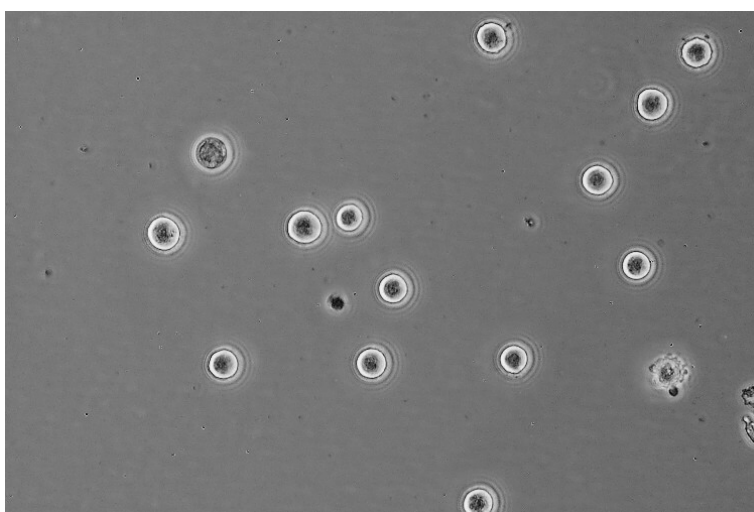
Figur 3.2: Analyse av flowcytometridata. a) "Dot plot" med breidda av signalet langs x-aksen og arealet til signaler langs y-aksen. Cellene i R1 veljast ut til vidare analyse. b) DNA-histogram med DNA-mengd langs x-aksen og relativt celletal langs y-aksen. Regionane M1, M2 og M3 inneheld celler frå høvesvis G_1 -, S- og G_2 -fase.

4 Resultat

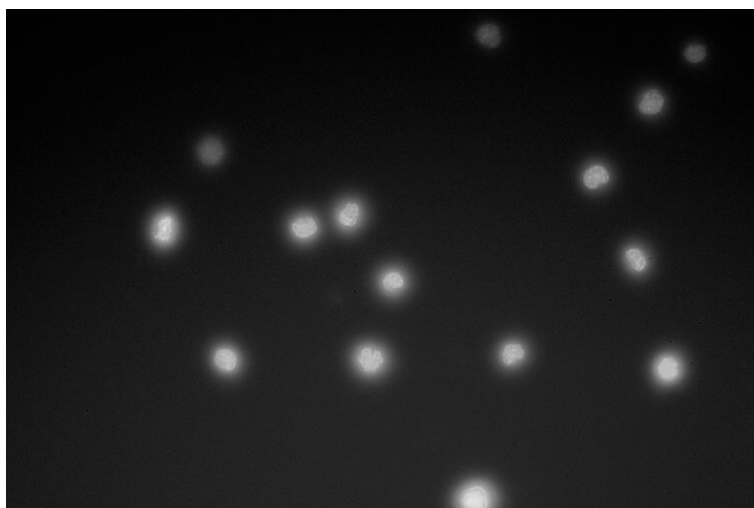
4.1 Celle- og kjernestorleik

Figur 4.1 a) og b) viser eksempel på fasekontrast- og fluorescensbilete tekne i dette eksperimentet. Fasekontrastbileta viser at cellene er sirkulære, som betyr at dei ikkje hadde festa seg til underlaget i celleflaska og flata ut innan bileta vart tekne. Ein kan derfor med god tilnærming bruke arealet til cellene til å berekne cellediameteren, som skildra i kap. 3.4.3. Fluorescensbiletet viser at cellekjernane hadde ei mindre regulær form.

a)



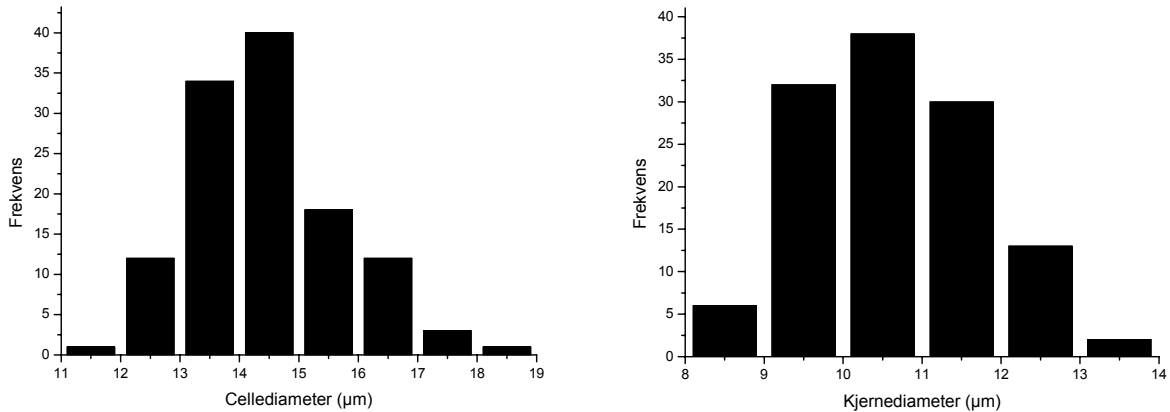
b)



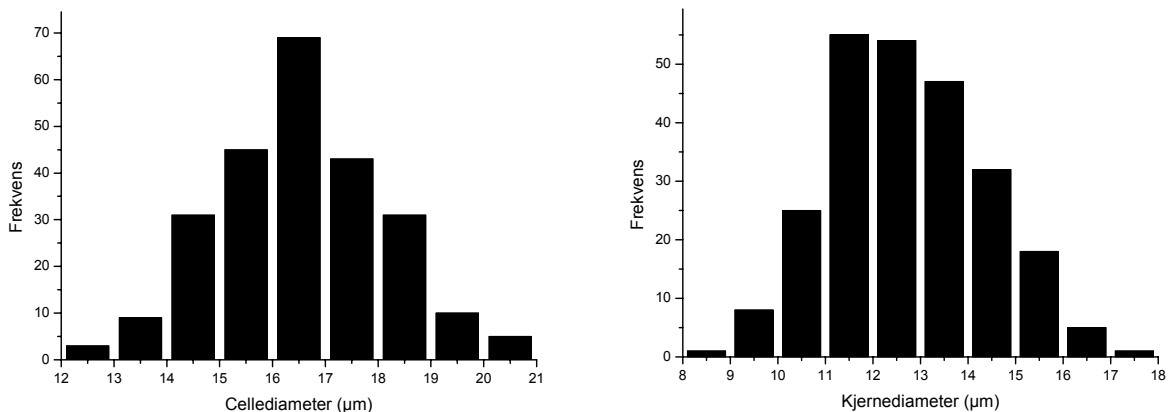
Figur 4.1: a) Fasekontrastbilete av NHIK 3025-celler. Berre dei cellene som ligg aleine vart valt ut for vidare analyse. b) Fluorescensbilete av cellekjernane til NHIK 3025-celler. Berre dei kjernane som ligg aleine vart nytta i den vidare analysen.

Figur 4.2 a) og b) viser histogram over celle- og kjernediametrane som vart funne i eksperimentet.

a) T-47D



b) NHIK 3025



Figur 4.2: a) Histogram over celle- og kjernediametrane for a) T-47D-celler og b) NHIK 3025-celler. Diametrane er funne ved analyse av fasekontrast- og fluorescensbilete av høvesvis heile celler og cellekjernar.

I appendiks B er dei cellulære S-verdiane (sjå kap. 2.4.2) for kombinasjonar av celle- og cellekjerneradiar viste. S-verdiane er gjevne for radiar i heile mikrometer (μm), derfor vert radiane i dette arbeidet runda av til nærmaste heile μm . Dette gjev T-47D-cellene ein

celleradius på 7 μm og kjerneradius på 6 μm og NHIK 3025-cellene ein celleradius på 9 μm og kjerneradius på 7 μm . Tabell 4.1 gjev gjennomsnittlege celle- og kjernediametrar med uvisse berekna ut i frå likningane 3.2 og 3.3. Dei korresponderande S-verdiane er også viste. Vi ser at begge celletypene har relativt store kjernar, dei utgjer høvesvis om lag 49 % og 45 % av det totale volumet til cella.

Tabell 4.1: Gjennomsnittleg celle- og kjernediameter med uvisse og korresponderande cellulære S-verdiar for T-47D- og NHIK 3025-celler.

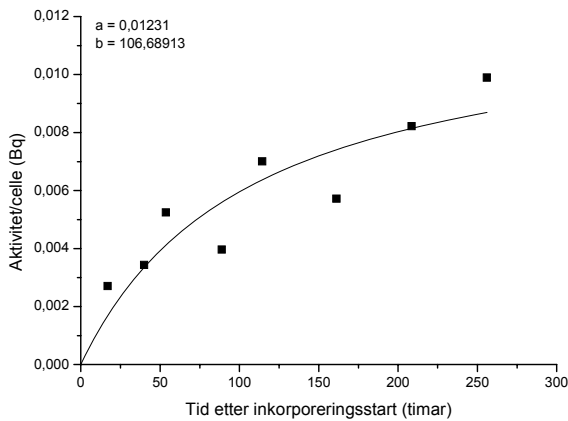
	Cellediameter (μm)	Kjernediameter (μm)	$S(N \leftarrow N)$ (Gy/Bq s)	$S(N \leftarrow Cy)$ (Gy/Bq s)
T-47D	14 ± 1	11 ± 1	$8,61 \times 10^{-4}$	$1,99 \times 10^{-4}$
NHIK 3025	17 ± 2	13 ± 2	$5,58 \times 10^{-4}$	$7,77 \times 10^{-5}$

4.2 Inkorporeringskinetikk

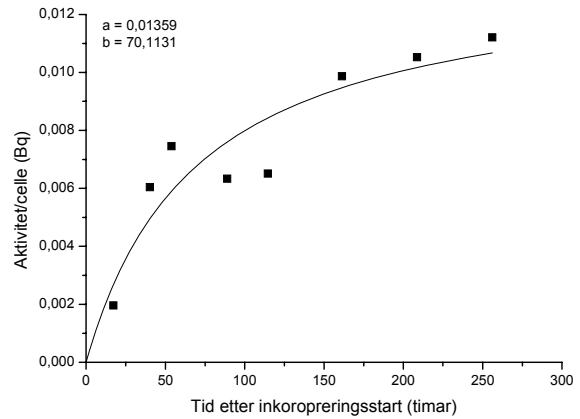
Figur 4.3 viser inkorporeringskurvene for T-47D- og NHIK 3025-cellene. Kurvene viser radioaktivitet per celle som funksjon av tida som hadde gått etter at cellene vart sådd ut på radioaktivt medium. Aktiviteten per celle vart funne ved å dele aktiviteten i kvar prøve, som vart funne ved hjelp av scintillasjonsteljing, på talet celler i prøva. Målepunkta representerer gjennomsnittsverdiane av resultat frå to teljingar på to prøver.

Vi ser frå figur 4.3 at aktiviteten per celle stig nokså raskt fram til om lag 100 timar etter inkorporeringsstart. I forsøk I1 ser denne stigninga i aktivitet ut til å fortsette nokså jamt også etter 100 timar, medan aktiviteten flatar noko ut i forsøk I2. Det er ei viss spreining på målepunkta, spesielt i forsøk I2. Scintillasjonsteljaren registrerer talet på desintegrasjonar per tidseining med stor nøyaktigheit, så variasjonen i målingane kan ha opphav i prepareringsprosessen eller i bestemminga av talet på celler i kvar prøve.

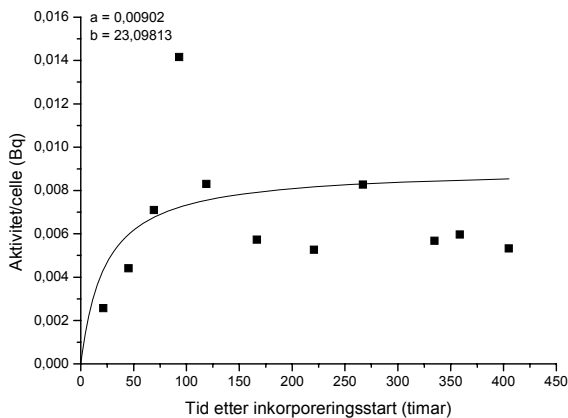
a) Forsøk I1: T-47D



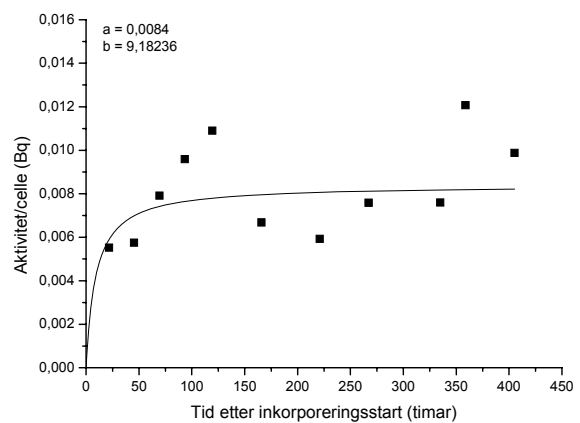
b) Forsøk I1: NHIK 3025



c) Forsøk I2: T-47D



d) Forsøk I2: NHIK 3025



Figur 4.3: Radioaktivitet av $[^3H]$ som funksjon av tid etter inkorporeringsstart for T-47D-celler (a og c) og NHIK 3025-celler (b og d). Aktiviteten vart målt ved scintillasjonsteljing og målingane gjeld heile celler.

Åste Søvik (2002) fann i si hovudoppgåve at funksjonen

$$y = \frac{ax}{b + x} \quad (4.1)$$

er passande til å beskrive inkorporeringskurvene, då den oppfyller grenseføresetnadane $y(x = 0) = 0$ og $y(x \rightarrow \infty) \rightarrow (\text{positiv})\text{konstant}$. Desse føresetnadane seier at ein ikkje har nokon aktivitet frå tritium i cellene ved starten av inkorporeringa og at aktiviteten per celle vil nå eit konstant nivå når det er oppnådd likevekt mellom syntese og degradering av protein

som inneheld tritiert valin. Linjene i figur 4.3 viser tilpassingane til funksjonen gjort ved hjelp av ikkje-lineær regresjon i programmet Origin.

Det vart også gjort scintillasjonsteljingar på dei radioaktive media, for å kontrollere at den berekna spesifikke aktiviteten tilsvarte den faktiske spesifikke aktiviteten. Tabell 4.2 viser dei berekna og eksperimentelt målte verdiane av aktivitet per volumeining for dei to ulike media brukt i denne oppgåva. Vi ser at dei målte verdiane ligg litt under den berekna aktiviteten. Dette kan komme av desintegrasjonen til tritium i løpet av forsøket, sidan berekningane for det radioaktive mediet vart gjort i juli 2002 (sjå appendiks E) og målingane på mediet vart gjort i slutten av 2003.

Tabell 4.2: Berekna og målte verdier av aktivitet per volumeining i medium med berekna spesifikk aktivitet 1,6 Ci/mol.

Medium	Berekna aktivitet per volumeining (Bq/ml)	Eksperimentelt målt aktivitet per volumeining (Bq/ml)
RPMI	$6,09 \times 10^4$	$(5,8 \pm 0,6) \times 10^4$
MEM	$6,09 \times 10^4$	$(5,8 \pm 0,6) \times 10^4$

4.3 Berekning av doseratar og totaldosar

For å kunne berekne doseratar og totaldose ut i frå likningane 2.16 og 2.17, var det nødvendig å bestemme korleis den intracellulære radioaktiviteten fordeler seg mellom cellekjernen og cytoplasma. I forsøk 2 vart det derfor gjort scintillasjonsteljingar på cellekjernar i tillegg til heile celler etter at aktivitetsnivået i heile celler var blitt konstant. Fraksjonen f_N av radioaktivitet lokalisert i cellekjernen i høve til heile celler vart berekna utifrå formelen:

$$f_N = \frac{\text{aktivitet/kjerne}}{\text{aktivitet/celle}} \quad (4.2)$$

Fraksjonen av radioaktivitet i cytoplasma i høve til i heile celler vart funne som:

$$f_{Cy} = 1 - f_N \quad (4.3)$$

Tabell 4.3 viser verdiane for radioaktivitet per celle i kjernen og i cytoplasma for dei to celletypene. Vi ser at fraksjonen av radioaktivitet i kjernane er større enn den fraksjonen som

cellekjernane utgjer av heile cella, noko som tyder på at proteinkonsentrasjonen er noko høgare i kjernen enn i cytoplasma.

For å finne doseraten, må vi finne aktiviteten per celle når denne har nådd eit stabilt nivå (*steady state*). Som nemnt over, går funksjonen i likning 4.1 som ein hyperbel med asymptote a , når tida går mot uendeleg. Funksjonen stig framleis svakt etter at den cellulære aktiviteten har stabilisert seg, og a -verdien vil dermed overestimere den cellulære aktiviteten. Aktivitet per celle bestemast derfor ut i frå dei målte verdiane for aktivitet i cella etter at *steady state* var nådd. Dei målte verdiane er henta frå inkorporeringsforsøka (alle målingane etter 100 timar, då ein reknar med at aktiviteten har stabilisert seg) og frå scintillasjonsteljingar gjort ved ulike tidspunkt seinare i bestrålingsperioden. For T-47D-cellene vart det utført teljingar på bestrålte celler i tidsrommet 63 til 87 dagar, medan det for NHIK 3025-celler vart gjort målingar i tidsrommet 63 til 150 dagar ut i bestrålingsforsøka. Aktiviteten per celle er gjeven som gjennomsnittsverdien av desse målingane. Tabell 4.3 viser gjennomsnittsverdiane for aktivitet per celle med uvisse for dei to celletypene.

Tabell 4.3: Fordelinga av radioaktiviteten i cella og aktivitet per celle, med uvisse, etter at *steady state* var nådd.

	Fraksjon av aktivitet i cellekjernen, f_N	Fraksjon av aktivitet i cytoplasma, f_{Cy}	Aktivitet/celle (Bq)
T-47D	$0,60 \pm 0,05$	$0,40 \pm 0,05$	$(7 \pm 2) \times 10^{-3}$
NHIK 3025	$0,607 \pm 0,001$	$0,393 \pm 0,001$	$(10 \pm 2) \times 10^{-3}$

For å kunne berekne totaldosen til cellekjernen i innsvingingsfasen av bestrålinga, må ein kunne kalkulere den integrerte aktiviteten til cellene, det vil seie talet på desintegrasjonar i løpet av perioden cellene har vorte bestrålte. Dette gjerast ved å integrere likning 4.1, som gjev:

$$\int_{x_1}^{x_2} \frac{ax}{b+x} dx = [ax - ab \ln(b+x)]_{x_1}^{x_2} \quad (4.4)$$

Tabell 4.4 viser integrert aktivitet per celle for dei to celletypene etter 100 timars bestråling, altså i perioden frå inkorporeringsstart og fram til *steady state* er nådd. Tabellen viser den integrerte aktiviteten frå begge inkorporeringsforsøka, i tillegg til gjennomsnittsverdiane med uvisse. Dei integrerte aktivitetane er berekna utifrå likning 4.4 med verdiane for a og b vist i figur 4.3.

Tabell 4.4: Integrert aktivitet i T-47D- og NHIK 3025-celler etter 100 timars bestråling. Det er vist verdier frå forsøk I1 og I2, i tillegg til middelerdiar med standard error.

	Integrert aktivitet Forsøk I1 (Bq s)	Integrert aktivitet Forsøk I2 (Bq s)	Integrert aktivitet Gjennomsnitt (Bq s)
T-47D	$1,30 \times 10^3$	$1,99 \times 10^3$	$(1,6 \pm 0,3) \times 10^3$
NHIK 3025	$1,85 \times 10^3$	$2,34 \times 10^3$	$(2,1 \pm 0,2) \times 10^3$

Ein set uttrykket for f_{Cy} frå likning 4.3 inn i uttrykka for doserate og totaldose (2.16 og 2.17) og får dermed:

$$\dot{D} = A_C [f_N S(N \leftarrow N) + (1 - f_N) S(N \leftarrow Cy)] \quad (4.5)$$

$$D = \tilde{A}_C [f_N S(N \leftarrow N) + (1 - f_N) S(S \leftarrow Cy)] \quad (4.6)$$

Doserate og totaldose er funksjonar av variablane f_N og høvesvis A_C og \tilde{A}_C . Dei tilhøyrande standardavvika vert dermed:

$$\Delta \dot{D} = \sqrt{\left(\left(\frac{\partial \dot{D}}{\partial A_C} \Delta A_C \right)^2 + \left(\frac{\partial \dot{D}}{\partial f_N} \Delta f_N \right)^2 \right)} \quad (4.7)$$

$$= \sqrt{(f_N S(N \leftarrow N) + (1 - f_N) S(N \leftarrow Cy))^2 \Delta A_C^2 + (A_C (S(N \leftarrow N) - S(N \leftarrow Cy)))^2 \Delta f_N^2}$$

$$\Delta D = \sqrt{\left(\left(\frac{\partial D}{\partial \tilde{A}_C} \Delta \tilde{A}_C \right)^2 + \left(\frac{\partial D}{\partial f_N} \Delta f_N \right)^2 \right)} \quad (4.8)$$

$$= \sqrt{(f_N S(N \leftarrow N) + (1 - f_N) S(N \leftarrow Cy))^2 \Delta \tilde{A}_C^2 + (\tilde{A}_C (S(N \leftarrow N) - S(N \leftarrow Cy)))^2 \Delta f_N^2}$$

Tabell 4.5 viser doseratane med uvisse til cellekjernen for tidspunkt etter at doseraten hadde nådd eit konstant nivå, etter om lag 100 timar. Doseratane og uvisse er berekna utifrå likningane 4.5 og 4.7

Tabell 4.5: Doseratar til cellekjernen etter at doseraten hadde nådd eit konstant nivå.

	Doserate (Gy/time)
T-47D	$0,015 \pm 0,004$
NHIK 3025	$0,013 \pm 0,003$

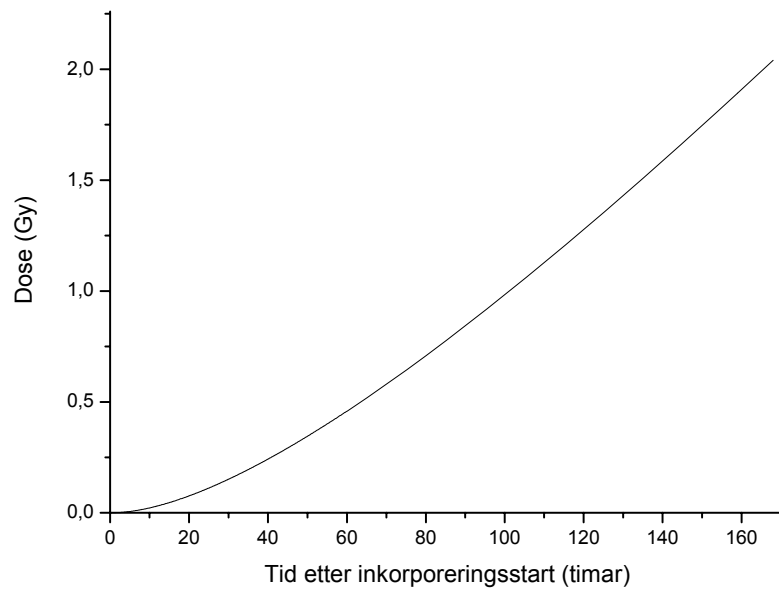
Tabell 4.6 viser resulterande totaldosar med uvisse til cellekjernen etter 100 timars -, ei veker- og tre vekers bestråling. Totaldosen etter 100 timar er berekna utifrå likning 4.6 og 4.8, medan dosane for ei og tre vekers bestråling er funne som summen av totaldosen etter 100 timar og høvesvis 68 og 404 timars bestråling med dei berekna doseratane (tabell 4.5). Sjølv om dei to celletypene vart dyrka på medium med same aktivitet, fører skilnadane i celle- og kjernestorleik og i inkorporeringskinetikk til at doserate og totaldosane til cellekjernane ikkje vert like.

Tabell 4.6: Totaldose med uvisse til cellekjernen ved ulike bestrålingssituasjonar for T-47D- og NHIK 3025-celler.

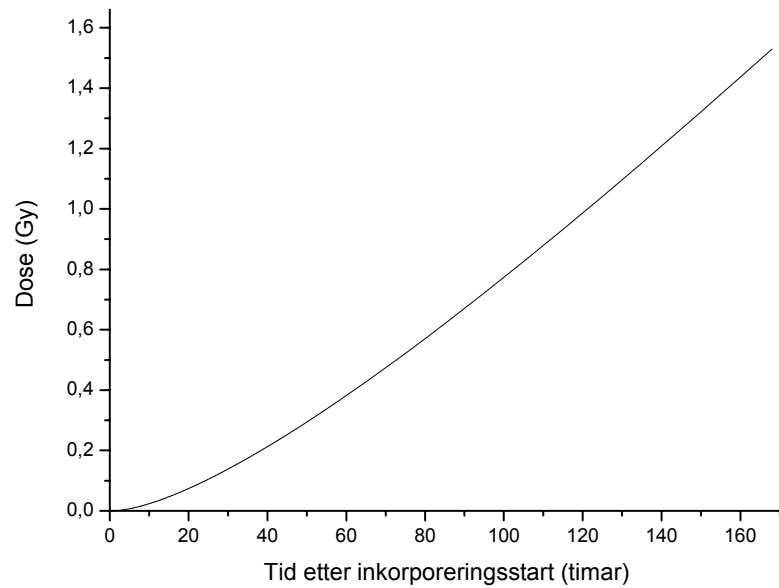
	Totaldose etter 100 timars bestråling (Gy)	Totaldose etter ei veker (0-100 + 68 timar) bestråling (Gy)	Totaldose etter tre veker (0-100 + 404 timar) bestråling (Gy)
T-47D	$1,0 \pm 0,2$	$2,0 \pm 0,5$	7 ± 2
NHIK 3025	$0,77 \pm 0,09$	$1,7 \pm 0,3$	6 ± 1

Figur 4.4 viser totaldosen til cellekjernen som funksjon av tida etter inkorporeringsstart for begge celletypene. Den integrerte aktiviteten er berekna ut i frå likning 4.4 og figuren er framstilt i programmet Origin. Vi kan sjå av figuren at etter om lag 100 timar stig dosen tilnærma lineært som funksjon av tida. Doseraten er då tilnærma konstant.

a) T-47D



b) NHIK 3025



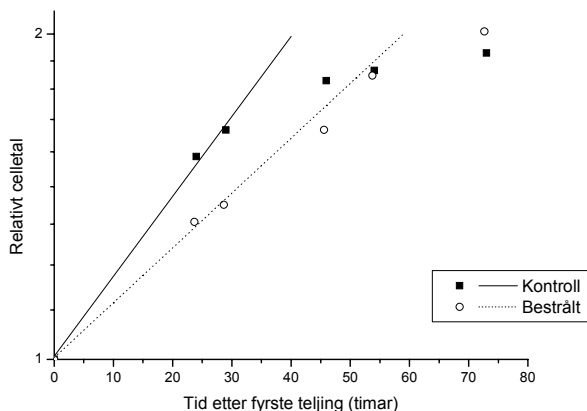
Figur 4.4: Totaldose til cellekjernen som funksjon av tida etter inkorporeringsstart for a) T-47D-celler og b) NHIK 3025-celler.

4.4 Doblingstider

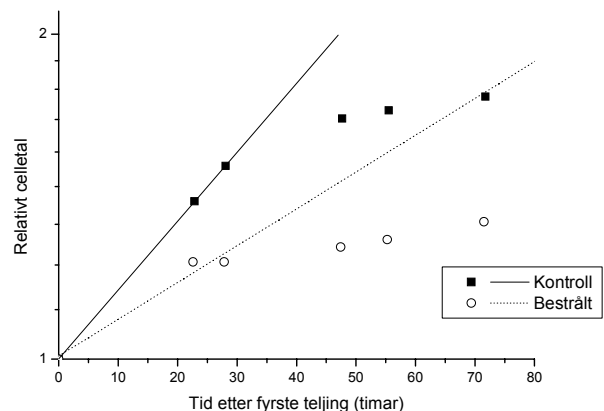
Det har blitt utført sju forsøk for å måle doblingstida til cellene. I forsøk D1-D4 vart det nytta T-47D-celler og i D5-D7 NHIK 3025-celler. Vekstkurvene vart framstilt med celletal relativt til talet på celler ved fyrste teljing langs ein logaritmisk y-akse og tid etter fyrste teljing langs den lineære x-aksen.

Figur 4.5 viser vekstkurvene for det fyrste forsøket med T-47D-celler. Linjene i figurane er tilpassa dei tre fyrste målepunkta. Etter den tredje teljinga, om lag 30 timar etter fyrste teljing, fekk cellene mediumskift. Vi ser frå figuren at celleveksten før og etter 30 timar ikkje er lik, men at vekstraten ser ut til å minke etter skifte av medium. Denne reduksjonen i vekstraten kan kome av mangel på kondisjonering i mediet på grunn av den låge celletettleiken som var nødvendig for å få gjort vekstforsøka. I dei vidare forsøka fekk derfor ikkje T-47D-cellene mediumskift onsdagen (2 dagar etter omsetjing).

a) Forsøk D1: Veke 1



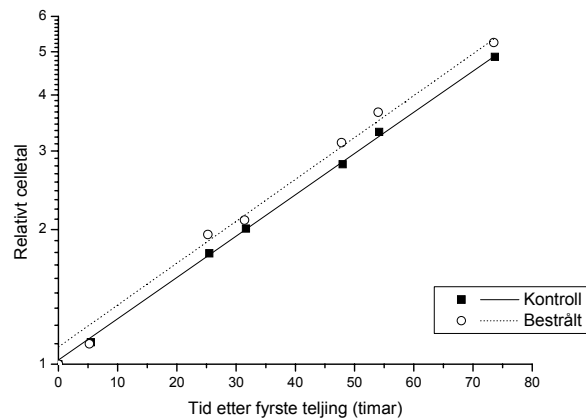
b) Forsøk D1: Veke 2



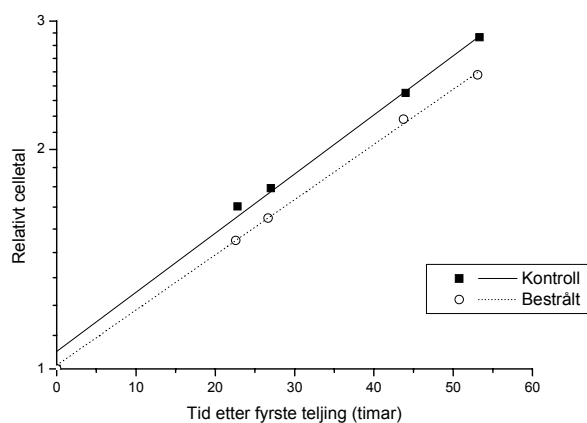
Figur 4.5: Vekstkurver frå forsøk D1 med T-47D-celler. Kurvene viser relativt celletal langs ein logaritmisk akse som funksjon av tida etter fyrste teljing langs lineær akse. a) Veke 1. b) Veke 2.

Figur 4.6 viser vekstkurver for T-47D etter at ein slutta å skifte medium i løpet av teljeperioden. Vi ser at celleveksten er jamn i heile teljeperioden.

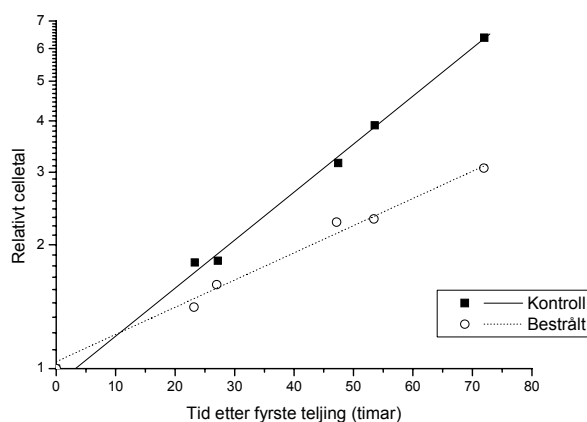
a) Veke 1



b) Veke 6



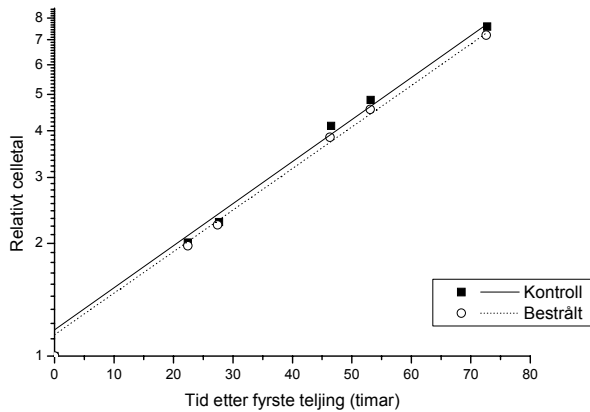
c) Veke 12



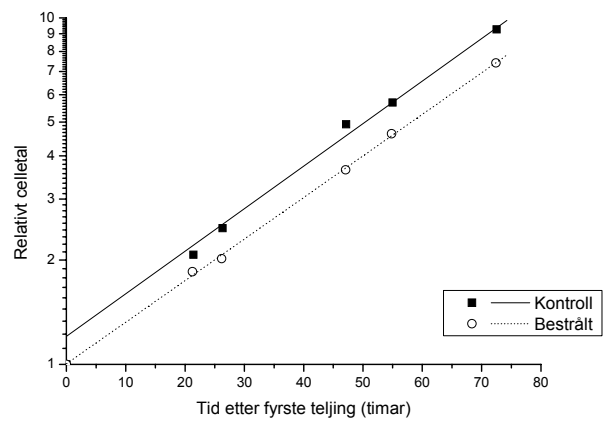
Figur 4.6: Vekstkurver T-47D frå a) veke 1, b) veke 6 og c) veke 12. Kurvene viser relativt celletal langs ein logaritmisk akse som funksjon av tida etter fyrste teljing langs lineær akse.

Figur 4.7 viser vekstkurver for NHIK 3025-cellene, det er vist kurver frå 1., 6., 12. og 22. bestrålingsveke. Vekstkurvene for dei resterande forsøka er viste i appendiks F.

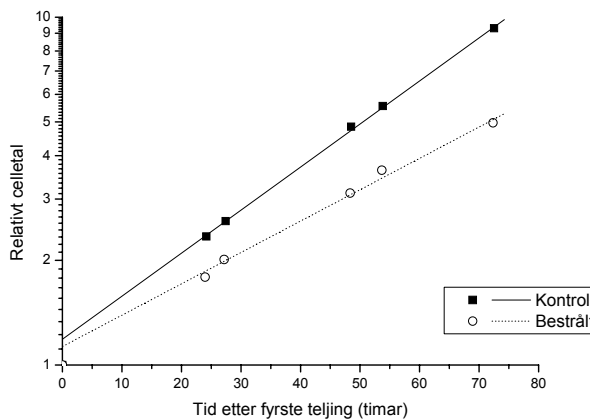
a) Veke 1



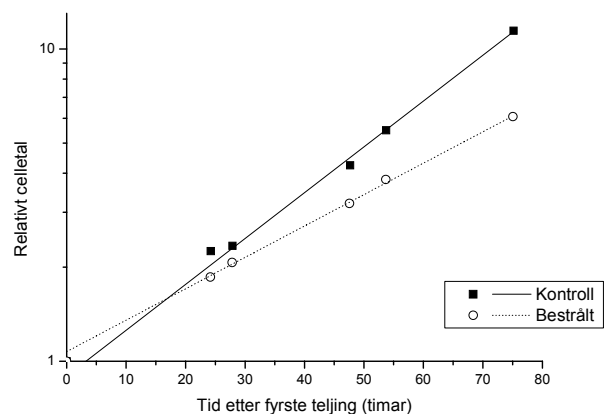
b) Veke 6



c) Veke 12



d) Veke 22



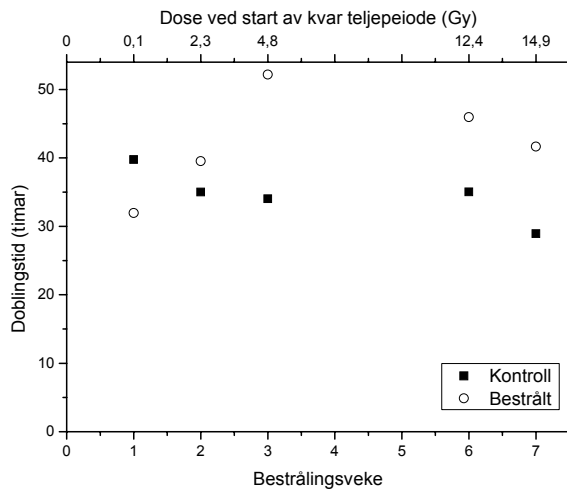
Figur 4.7: Vekstkurver for NHIK 3025-celler frå a) veke 1, b) veke 6, c) veke 12 og d) veke 22. Kurvene viser relativt celletal langs ein logaritmisk akse som funksjon av tida etter fyrste teljing langs lineær akse.

Alle forsøka er gjort i løpet av ulike bestrålingsperiodar. I forsøk D2 vart vekstkurvene registrert for sju veker med bestråling, men unntak av den fjerde og femte veka. I forsøk D3 vart det gjort teljingar i fire veker, medan vekstkurveregistreringa vart starta i femte bestrålingsveke i forsøk D4. Dette forsøket vart avslutta etter tolv veker med bestråling. I forsøk D5 vart vekstkurvene registrert i sju veker, i D6 i 14 veker og i D7 i 14 veker, med celler som allereie hadde vorte bestrålt i 8 veker.

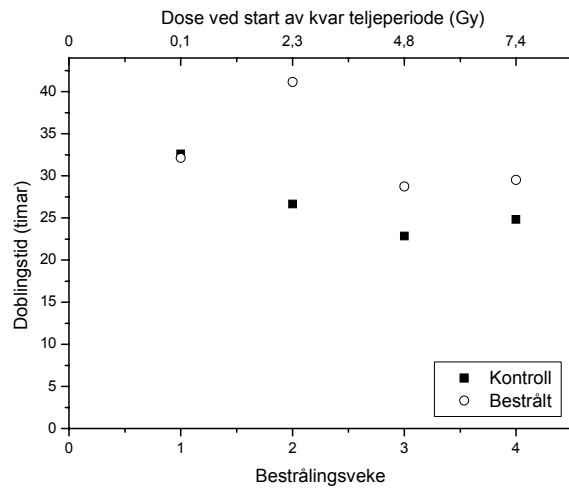
For forsøka D2-D7 er doblingstidene til cellene for kvar veke etter bestrålingsstart framstilt som funksjon av bestrålingsveke og dose. Kvar doblingstid er bestemt av teljingar som er gjort i løpet av 4 dagar (sjå kap. 3.6) og dosen vist i diagramma er dosen ved starten av kvar teljeperiode.

Figur 4.8 a) – c) viser resultata frå forsøka D2, D3 og D4, medan figur 4.9 a) – c) viser resultata frå forsøka D5, D6 og D7.

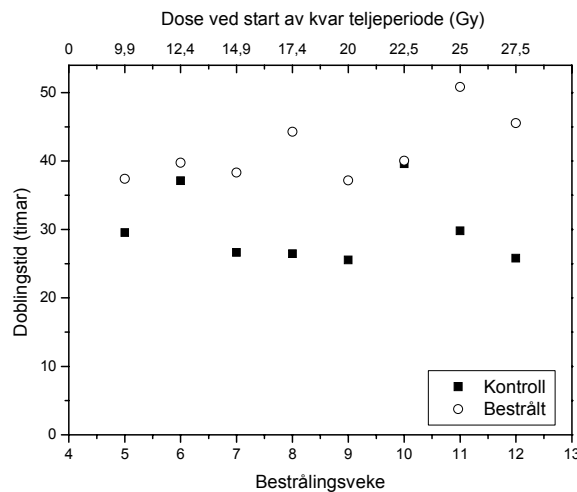
a) Forsøk D2:



b) Forsøk D3:

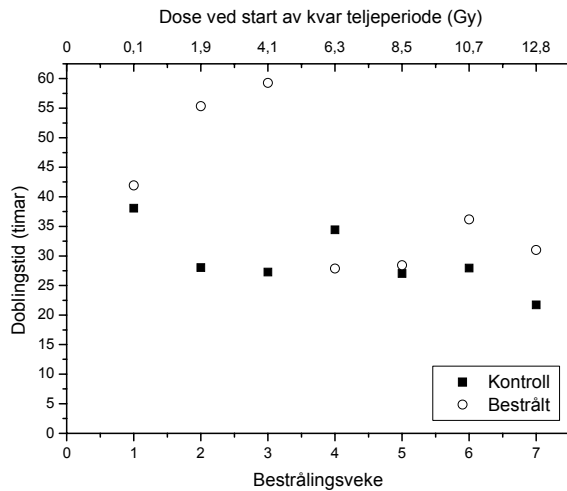


c) Forsøk D4:

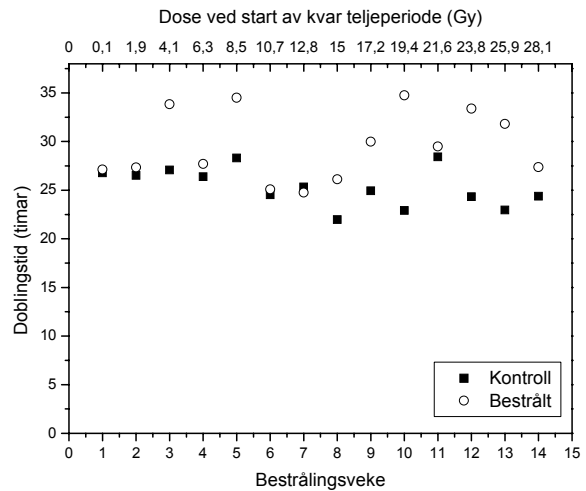


Figur 4.8: Doblingstida for T-47D-celler som funksjon av bestrålingsveke (nedre x-akse) og dose ved start av kvar teljeperiode (øvre x-akse). a) Forsøk D2. b) Forsøk D3. c) Forsøk D4. Bestrålinga starta i veke 1 og ein teljeperiode varte frå tysdag til fredag. Doblingstidene er bestemt ved hjelp av kurvetilpassing til eksponensielle vekstkurver av relativt celledetal som funksjon av tid, og er plotta som eit punkt gjeldande ei bestemt veke.

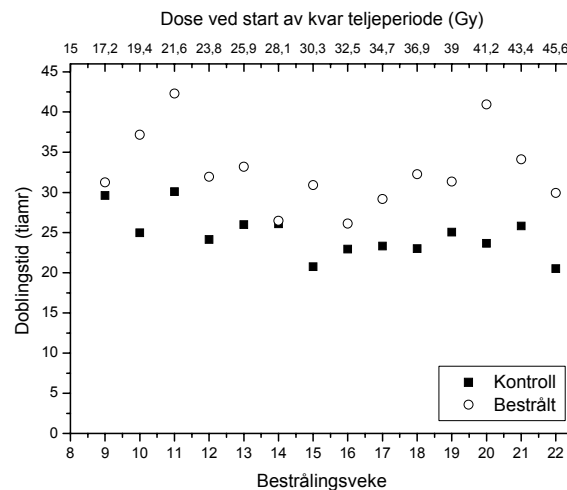
a) Forsøk D5:



b) Forsøk D6:



c) Forsøk D7:

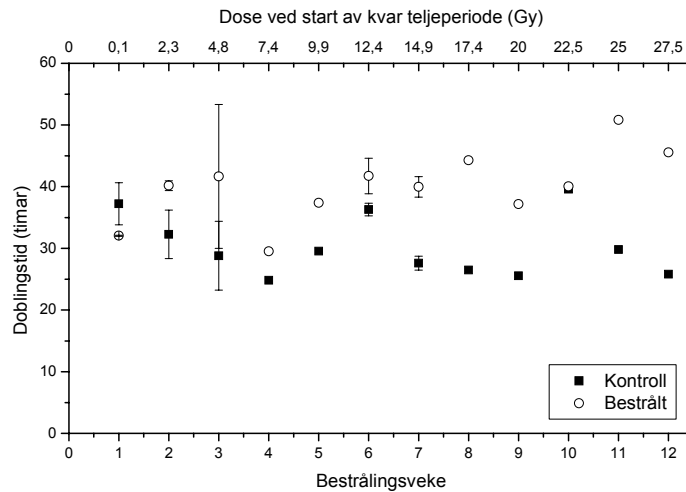


Figur 4.9: Doblingstida for NHIK 3025-celler som funksjon av bestrålingsveke (nedre x-akse) og dose ved start av kvar teljeperiode (øvre x-akse). a) Forsøk D5. b) Forsøk D6. c) Forsøk D7. Bestrålinga starta i veke 1 og ein teljeperiode varte frå tysdag til fredag. Doblingstidene er bestemt ved hjelp av kurvetilpassing til eksponensielle vekstkurver av relativt celletal som funksjon av tid, og er plotta som eit punkt gjeldande ei bestemt veke.

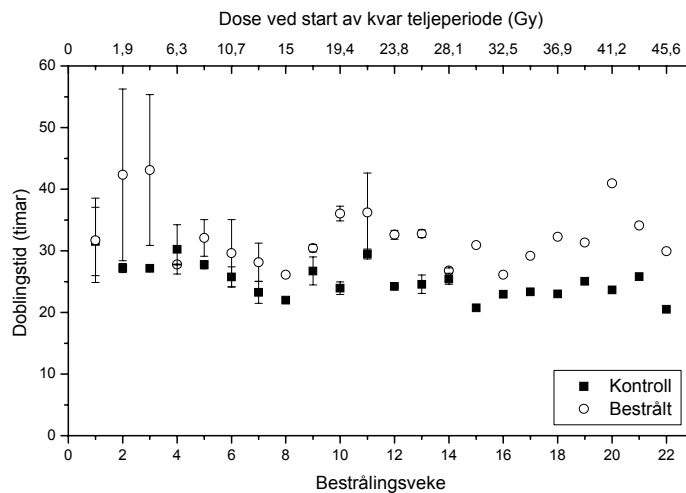
Figur 4.10 viser dei vekte middelerverdiane for doblingstidene med uvisse, berekna ut i frå linking 3.5 og 3.6. Vi ser at doblingstidene til både dei ubestrålte cellene og dei bestrålte cellene varierer noko i løpet av forsøka. Dette er ikkje uventa, då det er mange faktorar som påverkar cellene frå veke til veke (sjå drøfting, kap. 5.2). Vi ser av figuren at det allereie etter to vekers bestråling er ei auke i doblingstida til både T-47D-cellene og NHIK 3025-cellene.

Skilnaden i doblingstid mellom kontrollcellene og dei bestrålte cellene varierer noko frå veke til veke, men generelt så har dei bestrålte cellene ei lenger doblingstid enn kontrollcellene.

a) T-47D:



b) NHIK 3025:



Figur 4.10: Gjennomsnittleg doblingstid med uvisse for a) T-47D-celler, basert på forsøka D2, D3 og D4, og b) NHIK 3025-celler, basert på forsøka D5, D6 og D7. Doblingstidene vart bestemt ved hjelp av kurvetilpassing til eksponensielle vekstkurver av relativt celletal som funksjon av tid. Bestrålinga starta i veke 1. Ein teljeperiode varte frå tysdag til fredag, men doblingstida er her plotta som eit punkt gjeldande for ei bestemt veke.

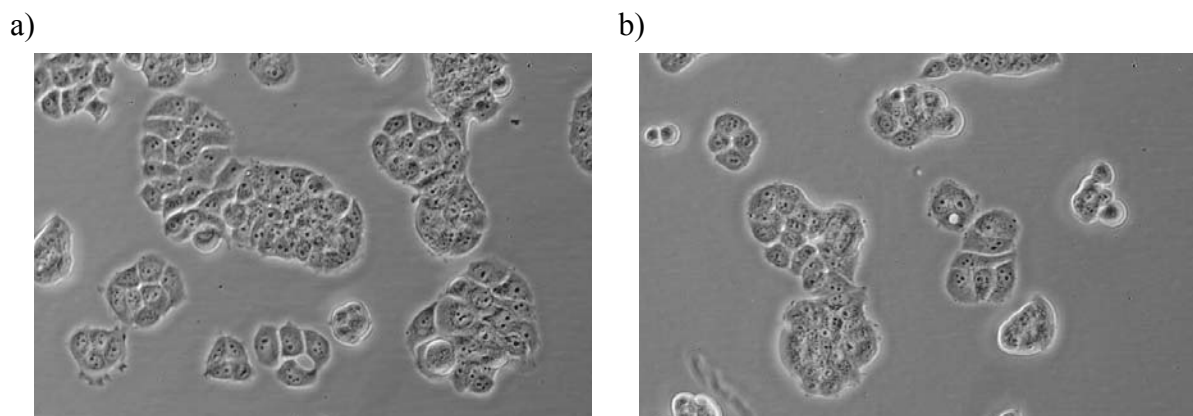
For dei ubestrålte kontrollcellene vart den gjennomsnittlege doblingstida berekna som den vekta middelveien av alle forsøka. Tabell 4.7 viser dei vekta doblingstidene til kontrollcellene frå kvart forsøk, i tillegg til den gjennomsnittlege doblingstida med uvisse.

Tabell 4.7: Vekta doblingstider for ubestrålte T-47D- og NHIK 3025-celler.

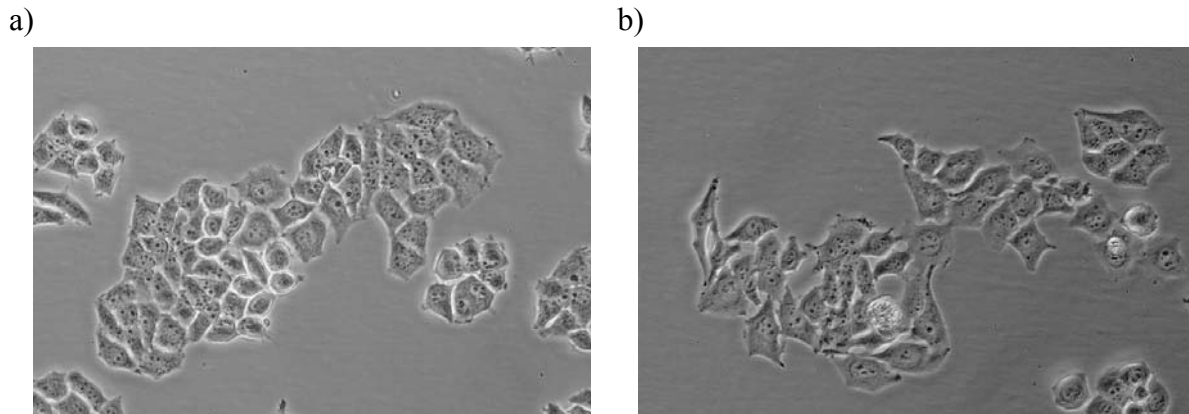
	Forsøk D2	Forsøk D3	Forsøk D4	Gjennomsnittleg doblingstid (timar)
T-47D	35 ± 2	26 ± 2	30 ± 2	31 ± 3

	Forsøk D5	Forsøk D6	Forsøk D7	Gjennomsnittleg doblingstid (timar)
NHIK 3025	29 ± 2	$25,3 \pm 0,5$	$24,7 \pm 0,7$	$25,7 \pm 0,6$

I løpet av desse eksperimenta vart det også teke bilete av cellene ved ulike tidspunkt i løpet av bestrålingsperioden, for å observere eventuelle endringar i morfologien til cellene. Figur 4.11 viser bilete av T-47D-celler medan figur 4.12 viser NHIK 3025-celler. Alle bileta er tekne 7 veker ut i forsøket, noko som tilsvarer ein dose på om lag 25 og 22 Gy for høvesvis T-47D- og NHIK 3025-cellene. Vi ser at der er inga endring i utsjånaden til cellene etter 7 veker bestråling. Det vart heller ikkje observert noka signifikant endring ved seinare tidspunkt av bestrålinga.



Figur 4.11: Bilete av T-47D-celler. a) Ubeestrålte celler. b) Celler som har vorte bestrålt i 7 veker, til ein totaldose på om lag 25 Gy.



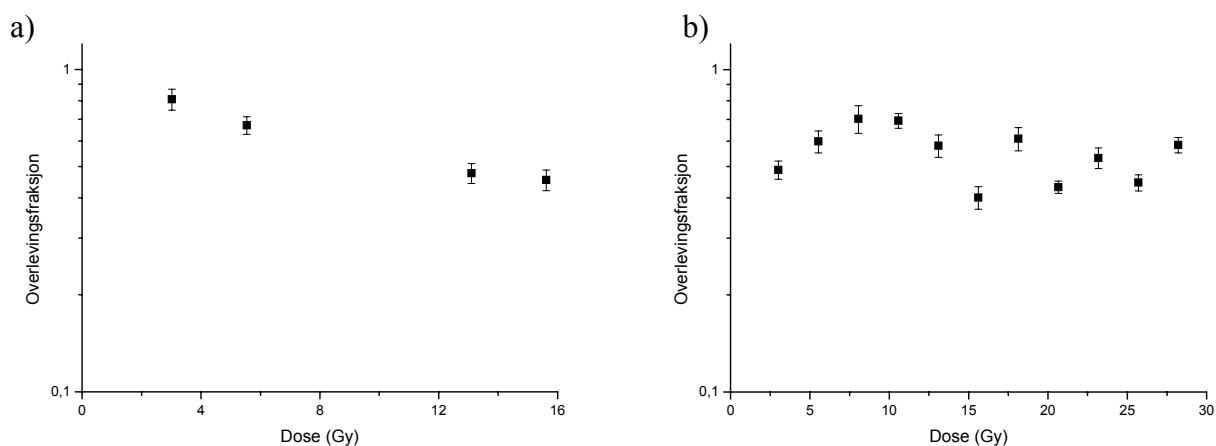
Figur 4.12: Bilete av NHIK 3025-celler. a) Ubestrålte celler. b) Celler som har vorte bestrålt i 7 veker, til ein totaldose på om lag 22 Gy.

4.5 Celleoverleving

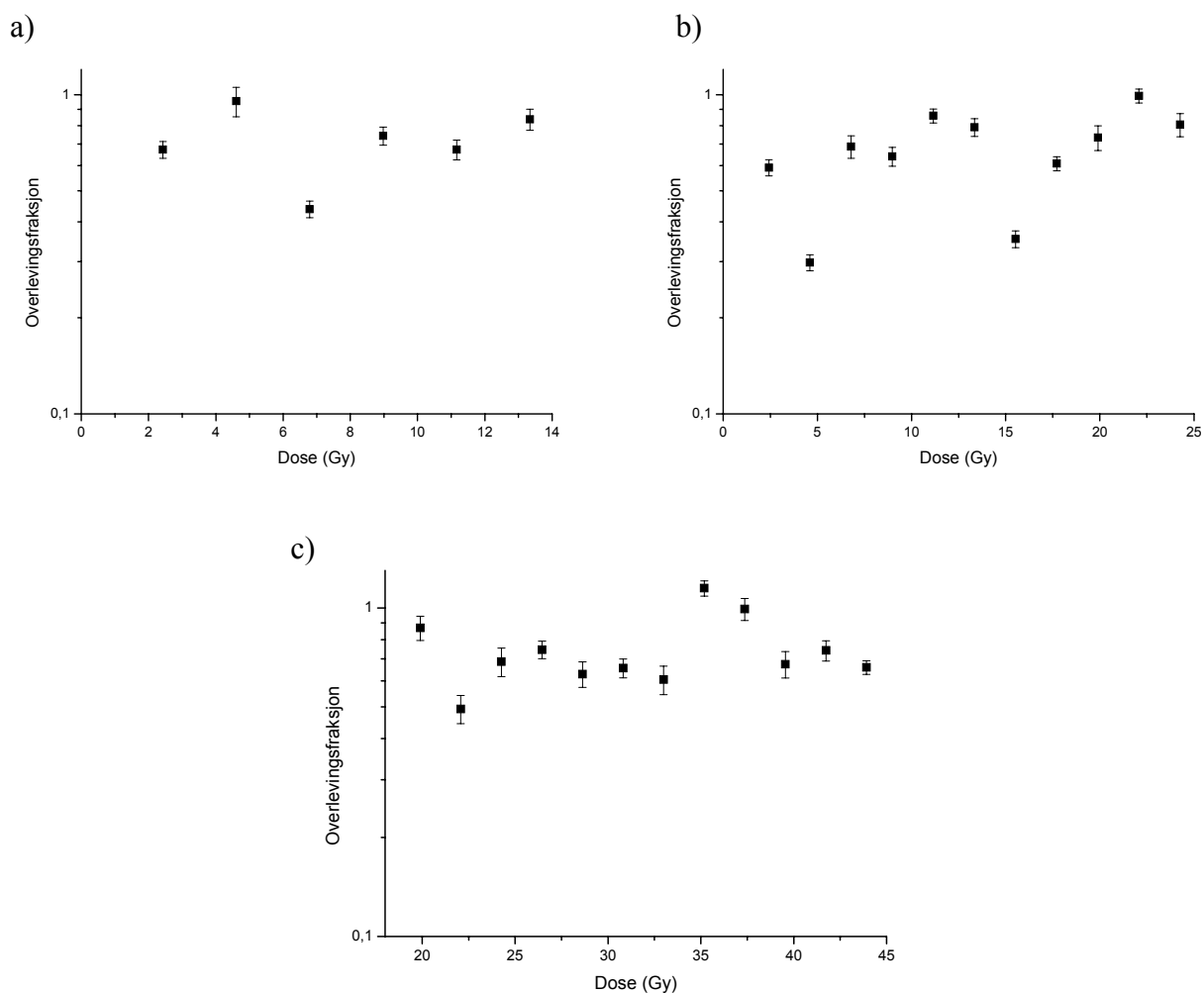
Det har blitt utført seks celleoverlevingsforsøk, tre for kvar celletype. I eit av forsøka festa ikkje T-47D-cellene seg ordentlig til underlaget i skålene og danna derfor ikkje koloniar. Sidan dette forsøket mangla koloniar, kunne det ikkje brukast. Det vert derfor i det følgjande presentert resultat frå fem overlevingsforsøk. Desse fem forsøka er alle gjort i løpet av ulike bestrålingsperiodar. I forsøka O1 til O4 vart det gjort koloniforsøk frå fyrste bestrålingsveke og kvar veke utover, med unntak i forsøk O1, der det ikkje vart sådd ut koloniar den fjerde og femte veka. Det siste overlevingsforsøket med NHIK 3025-celler, forsøk O5, vart gjort med celler som allereie hadde vorte bestrålt i 8 veker. Rådata frå celleoverlevingsforsøka er viste i appendiks G.

I desse celleoverlevingsforsøka fekk cellene eit bidrag til totaldosen også etter at dei vart sådd ut på medium utan tritiert valin. Dette fordi det tek tid før den tritierte valien inkorporert i proteina til cellene vert utkonkurrert av den kalde valinen i mediet utan radioaktivitet. Vi reknar dette dosebidraget å vere like stort som bidraget i innsvingningsfasen. Det er teke omsyn til dette i utrekningane av totaldosane.

Figur 4.13 a) og b) viser celleoverlevingskurvene til T-47D-cellene, medan figur 4.14 a), b) og c) viser celleoverlevingskurvene for NHIK 3025-cellene. Vi ser av figurane at begge celletypene tolererer doseraten gjennom heile bestrålingsperioden. Det visast ei minke i celleoverlevinga ned til om lag 60-80 % allereie etter eit par vekers bestråling, men noko vidare minke skjer ikkje.



Figur 4.13: Overlevingsfraksjonar som funksjon av dose for T-47D-celler. a) Forsøk O1. b) Forsøk O2. Kvart punkt representerer overlevingsfraksjonen frå eit forsøk og standardfeilen er vist med dei vertikale linjene.

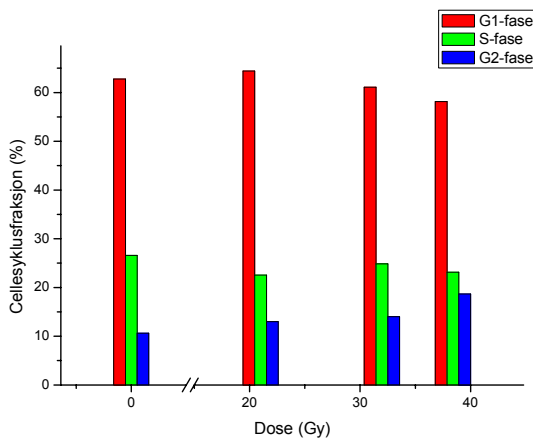


Figur 4.14: Overlevingsfraksjonar som funksjon av dose for NHIK-3025-celler. a) Forsøk O3. b) Forsøk O4. c) Forsøk O5. Kvart punkt representerer overlevingsfraksjonen frå eit forsøk og standardfeilen er vist med dei vertikale linjene.

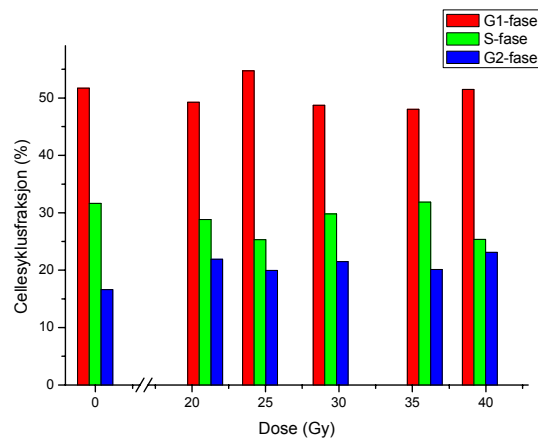
4.6 Flowcytometridata

Det vart utført tre flowcytometriforsøk for T-47D-cellene og fem for NHIK 3025-cellene, ved ulike tidspunkt i bestrålingsperiodane. I kvart forsøk vart det undersøkt både bestrålte celler og ein ubestrålt kontroll. DNA-histogramma for dei ulike forsøka er viste i appendiks H. Figur 4.15 viser cellesyklusfordelingane for cellene som funksjon av totaldosen cellene har fått. Dei ubestrålte cellene si fordeling i cellesyklus er midla, og denne cellesyklusfraksjonen er vist ved dosen 0. Vi ser at cellene er stabilt fordelt i cellesyklus gjennom forsøka og at den er relativt lik frå dose til dose. Det finnast ingen tydelege endringar i cellesyklusfordelingane i løpet av forsøka.

a) T-47D



b) NHIK 3025



Figur 4.15: Fraksjonen av celler i kvar av fasane i cellesyklus ved ulike tidspunkt i bestrålingsperiodane for a) T-47D-celler og b) NHIK 3025-celler. Data er funne ved analyse av flowcytometrimålingar.

5 Drøfting

5.1 Dosar og doseratar

Scintillasjonsteljaren registrerte talet på desintegrasjonar per tidseining med stor målepresisjon, der uvisse i måleverdiane var av storleiken ein promille eller mindre. Uvisse i målingane av inkorporert radioaktivitet låg difor i bestemming av talet på celler eller cellekjernar i prøvene.

5.1.1 Måling av inkorporert radioaktivitet

Etter at ein har tatt ut ei bestemt mengd suspensjon for å bestemme celle- eller kjernetalet, skal cellene/kjernane sentrifugerast ein siste gong for å fjerne PCA før NaDOC tilsetjast. Det er viktig å sørgje for at ein ikkje misser nokon celler eller kjernar i denne siste sentrifugeringa. Dette vil nemlig føre til at ein overestimerer talet på celler/kjernar i prøvene og dermed underestimerer aktiviteten per celle/kjerne.

Sjølve bestemminga av talet på celler/kjernar per prøve ved teljing i Bürkerkammer kan også vere kjelde til ei uvisse. Ein er her avhengig av at dekkglaset ligg rett på kantane av kammeret, for at volumet i kammeret skal bli riktig, samtidig som at nokon av cellene også kan bli sitjande fast i pipetten når ein overfører suspensjonen til kammeret (Kielberg *et al.*, 2001). Det var difor viktig å prøve å utføre prepareringa og Bürkerkammerteljningane så nøyaktig så mogeleg, for at desse feilkjeldene skulle få minimal effekt.

Scintillasjonsteljingane på cellene i tidsrommet 70 til 150 dagar med bestråling viste at den intracellulære aktiviteten var stabil på det same nivået som vart nådd etter omlag 100 timar. Det vart altså ikkje observert nokon unormal akselerert degenerasjon av tritium i løpet av dette arbeidet og doseraten til cellekjernen har vore konstant. Sjølv om det er ei viss spreiding på dei målte verdiane i inkorporeringsforsøka, synast resultatet likevel å gje ei god skildring av inkorporeringsforløpet til den radioaktive valinen i cellene.

5.1.2 Celle- og kjernestorleik

Vi brukte ein metode som lét oss måle celle- og kjernestorleik på levande celler, der cellekjernane ikkje har endra form som følgje av fiksering. Vi gjekk ut i frå at trypsineringa av cellene berre endra forma og ikkje storleiken deira. Vi rekna òg med at DNA-farginga med

Hoechst 33342 ikkje endra cella eller kjernen sin storleik sidan inkubasjonstida før målingane vart utført, var relativt kort (Zhang og Kiechle, 1997).

Modellen for cellulær dosimetri nytta i denne oppgåva, går som skildra i kap. 2.4.2 ut i frå at det cellulære systemet består av to konsentriske kuler (sjå figur 2.8). Dette representerer ei forenkling av systemet. Celler som veks festa til eit underlag, er ikkje kuleforma, men dei flatar ut mot underlaget. Det at celler veks i koloniar, fører til at kvar celle si form er avhengig av og vert påverka av nabocella. Effekten av ein endra geometri vert diskutert av Goddu *et al.* (1997). Dei beskriv eit alternativt system beståande av to konsentriske ellipsoidar. For radioaktivitet lokalisert i cellekjernen har denne endringa i geometri lite å seie for S-verdien og dermed for doseavsetjinga. For radioaktiviteten lokalisert i cytoplasma, vil effekten av endra geometri vere større. Men bruken av tritium som har ei relativt kort rekkjevidde kombinert med dei relativt store cellekjernane, vil føre til at hovuddelen av doseavsetjinga til cellekjernen kjem av radioaktivitet lokalisert i kjernen. Føresetnaden om eit symmetrisk sfærisk cellulært system vil difor ikkje representere noko stor feilkjelde i dette arbeidet.

Berekningane er basert på at både cellene og cellekjernane var sirkulære. Mikroskoperinga og fotografa tekne i dette eksperimentet stadfesta at cellene var sirkulære så lenge dei var i suspensjon, medan kjernane hadde noko meir uregelmessig form. Programmet Image Tool, som vart nytta til analyse av celle- og kjernebileta, gav i tillegg til feretdiameteren ei rekkje andre parametrar for objekta som vart analysert. Ein av desse parametranne var *roundness*. Denne verdien er berekna utifrå formelen $4\pi A/O^2$, der A er arealet og O er omkrinsen til objektet. Formelen gjev eit tal mellom 0 og 1, og dess nærmare 1 talet er, dess rundare er objektet. For å teste om *roundness*-verdien hadde noko betydning, vart det fyrst valt ut objekt med ein *roundness*-verdi på 0,8 eller høgare for vidare analyse. Denne seleksjonen representerte om lag 60 % av alle kjernane som det var teke bilete av. Sidan seleksjonen førte til at ein relativt stor fraksjon av objekta vart utelate, vart det i tillegg utført analysar på alle kjernane. Det viste seg at diametranne som vart funne med begge utvala av kjernar var like og det vart difor bestemt å inkludere alle kjernane.

Figur 4.2 viser histogram over celle- og kjernediametrane. Variasjonen i diametranne kjem fyrst og fremst av den biologiske variasjonen og i mindre grad av ei viss uvisse i målemetoden. I løpet av ein cellesyklus doblar cellene heile volumet sitt, også kjernevolumet, noko som betyr omlag 26 % auke i diameter. Då vi nytta usynkroniserte celler (celler i ulike fasar av cellesyklus), var det difor venta ei spreiding av diametranne. Den dosimetriske modellen som vart brukt, tek ikkje omsyn til det varierende celle- og kjernevolumet i løpet av cellesyklus, men gjev dosar og doseratar som er middelerdiar for ein populasjon av celler. Vi

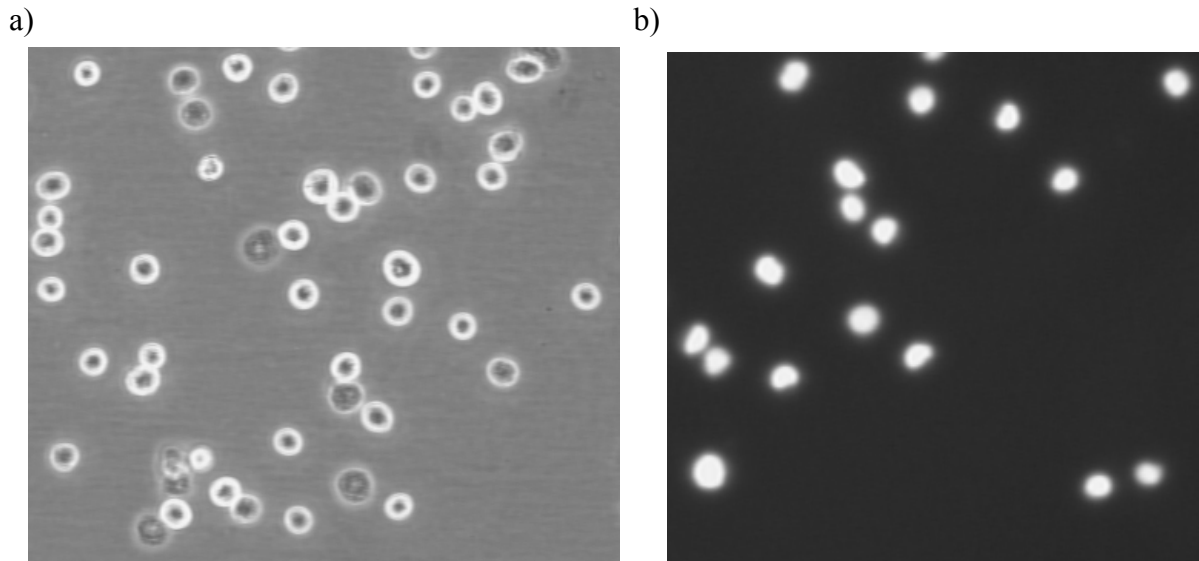
berekna difor dei gjennomsnittlege celle- og kjernediametrane og brukte desse som representative verdiar for populasjonar av respektivt T-47D- og NHIK 3025-celler.

Som skildra i kap. 3.4, vart det nytta ubestrålte kontrollceller til å bestemme celle- og kjernediametrane. Det vart ikkje observert endringar i morfologien til dei bestrålte cellene i høve til kontrollcellene i løpet av doblingstidsforsøka (sjå figurane 4.11 og 4.12). Det vart heller ikkje observert noko endring i cellesyklusfordelinga (sjå figur 4.15). Det er difor ingen grunn til å tru at diametrane bestemt i dette arbeidet ikkje er representativt for cellene gjennom heile bestrålingsperioden.

Tabell 5.1 viser cellediameteren til T-47D-celler frå ulike studiar. Vi ser av tabellen at resultatet frå føreliggjande oppgåve stemmer bra overeins med diameteren funne av Palmer *et al.* (2003). Diameteren vart derimot funne til å vere større av Søvik (2002). Figur 5.1 viser bilete tekne i arbeidet til Søvik. Vi ser at oppløysinga på desse bileta er svært dårleg og det er ikkje mogeleg å sjå nøyaktig kor cellene og kjernane er avgrensa. Bruken av eit nytt kamera i vårt eksperiment, gav bilete med høgare oppløysing enn hos Søvik (sjå figur 4.1). I desse bileta kunne ein lett sjå kor cellene og kjernane var avgrensa for så å merke dette området ved hjelp av Image Tool. Det er difor rimeleg å gå ut i frå at diameterane funne i føreliggjande oppgåve gjev ei meir korrekt skildring av celle- og kjernediametrane.

Tabell 5.1: Cellediameter til T-47D-celler funne i ulike studiar.

	Cellediameter (μm)
Søvik (2002)	19 ± 1
Palmer <i>et al.</i> (2003)	14 ± 2
Føreliggjande oppgåve	14 ± 1



Figur 5.1: Bilete tekne i arbeidet til Søvik (2002), for å måle celle- og kjernestørleiken til T-47D-celler. a) viser fasekontrastbilete av heile celler, medan b) viser fluorescensbilete av cellekjernar.

Steen og Lindmo (1978) har ved hjelp av ein Coulterteljar målt volumet til NHIK 3025-celler og funne volumet til cella og cellekjernen i dei ulike fasane av cellesyklus. Dei fann volumfordelingane som funksjon av *channel number*, som er ei vilkårleg eining som er proporsjonal til cellevolumet. Ein kan difor ikkje direkte samanlikne deira celle- og kjernediametrar med våre. Men dei har vist fraksjonen cellevolum/kjernevolum, som kan gjerast om til eit forhold mellom celle- og kjernediametrane. Tabell 5.2 viser fraksjonen $d_{\text{celle}}/d_{\text{kjerne}}$ omrekna frå Steen og Lindmo sine data og fraksjonen funne i denne oppgåva. Tabellen viser at cellediameteren er 70 % større enn kjernediameteren i Steen og Lindmo sine målingar, medan den er 30 % større i denne oppgåva. Steen og Lindmo dyrka NHIK 3025-cellene i mediet E2a med 30 % humant serum. Vi kan difor ikkje forvente at fraksjonane er like i dei to studia, då størleiken til cellene og kjernane kan variere med blant anna mengda og typen serum nytta i mediet. Til dømes er den mediane cellesykluslida omlag 18 timar for celler dyrka i E2a, medan den er omlag 24 timar i MEM med føtalt kalveserum som vi nyttar i denne oppgåva.

Tabell 5.2: Fraksjonen cellediameter/kjernediameter funne i ulike studiar.

	Fraksjonen $d_{\text{celle}}/d_{\text{kjerne}}$
Steen og Lindmo (1978)	1,7
Føreliggjande oppgåve	1,3

Sidan resultata funne for T-47D-cellene stemmer overeins i dei ulike arbeida, er det rimeleg å anta at metoden nytta for å måle celle- og kjernediameter også gjev eit korrekt bilete av storleiken til NHIK 3025-cellene. Skilnaden mellom resultatet til Steen og Lindmo og dei funne i denne oppgåva har truleg å gjere med dei ulike veksttilhøva.

5.1.3 Berekning av dosar og doseratar

Berekninga av integrert aktivitet er avhengig av funksjonen valt i tilpassinga av kurvene av dei eksperimentelle data over cellulær aktivitet som funksjon av tid. Den utvalte funksjonen, vist i likning 4.1, ser ut til å beskrive data bra i innsvingingsforløpet, men som skildra i kap. 4.3 vil funksjonen overestimere aktiviteten når bestrålingstida aukar. Dette løysast likevel enkelt ved at dosen ved desse tidspunkta vert berekna ut i frå den konstante doseraten som gjeld etter at *steady state* er nådd, det vil seie etter omlag 100 timar.

Vi ser av tabellane 4.5 og 4.6 at der er relativt stor uvisse i dei berekna doseratane og totaldosane. Dei relative uvissene ligg i overkant av 25 % for T-47D-cellene og i overkant av 20 % for NHIK 3025-cellene. Dette kjem av spreininga i data frå målingane av inkorporert radioaktivitet per celle, som er skildra over.

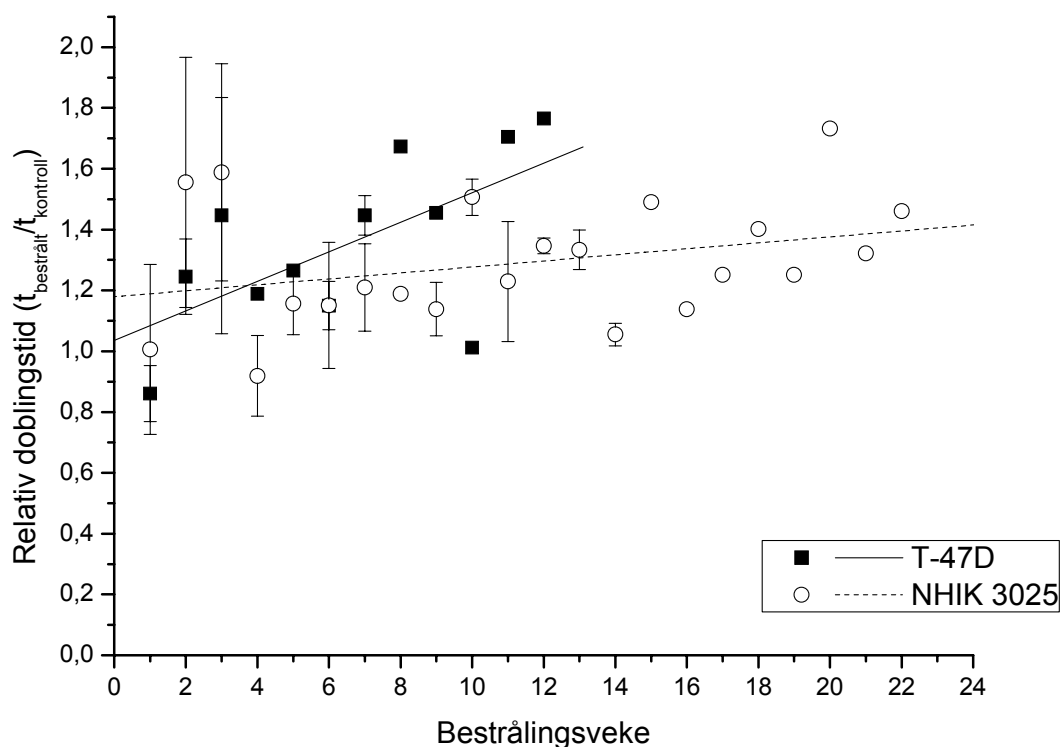
5.2 Doblingstider

Vi oppdaga tidleg i desse eksperimenta at auka i celletal ikkje var eksponensielt for T-47D-cellene etter mediumskift, sjå figur 4.5. Det såg tvert om ut til at celleveksten vart redusert, noko som ikkje skjer under vanleg dyrking av stamkulturar. Cellene i stamkulturar får vanlegvis mediumskift fordi dei treng jamleg tilførsel av næringsstoff og vekstfaktorar. I stamkulturar er derimot celletalet høgt slik at cellene sjølv produserer store mengder humane vekstfaktorar. I desse forsøka vart det sådd ut så få celler at det kunne vere behov for kondisjonering av mediet. På den andre sida var det då heller ikkje venta at cellene ville få mangel på næringsstoff eller opphoping av avfallstoff som ville påverke celleveksten i løpet av teljeperioden med så få celler i flasken. Etter dei innleiande forsøka vist i figur 4.5 vart mediumskift difor kutta ut. Vekstkurvene frå resten av doblingstidsforsøka med T-47D-celler viser at cellene veks eksponensielt i 4 døgn utan mediumskift (sjå figur 4.6 og appendiks F).

Elles i forsøka D2-D6, ser vi at celleveksten varierer noko frå veke til veke. Slik variasjon er heilt vanleg, utan at årsaka er heilt klar. Ein kan spekulere i om det kan kome av små variasjonar i media og trypsin som vert nytta. Tida cellene trong på å lausne frå celleflaska og nabocellene i samband med omsetjing, varierte noko frå veke til veke. Den tida som cellene

låg på trypsin, varierte derfor tilsvarende, og er ein faktor som godt kan tenkjast å føre til små endringar i celleveksten.

Figur 5.2 viser doblingstida for bestrålte relativt til ubestrålte celler for dei to ulike celletypene som funksjon av bestrålingstid. Linjene i diagrammet er ei lineærtilpassing gjort i programmet Origin. Figuren viser at både dei bestrålte T-47D- og NHIK 3025-cellene har ei lenger doblingstid enn kontrollcellene. Vi ser også at den auka doblingstida til NHIK 3025-cellene ser ut til å vere relativt stabil utover i forsøket. Lineærtilpassinga til målepunkta viser berre ei lita stigning i løpet av bestrålingsvekene. For T-47D-cellene derimot, synast ei mykje klarare auke i doblingstid for dei bestrålte cellene utover i doblingstidsforsøka. Skilnaden i relativ doblingstid mellom dei to celletypene kan kome av dei ulike absolutte doblingstidene til cellene. NHIK 3025-cellene har ei kortare cellesyklusid enn T-47D-cellene (tabell 4.7). Kontinuerlig bestråling kan vere meir skadeleg for celler med lange cellesyklusar enn celler med kortare cellesyklusar, sidan ein større dose vert absorbert per cellesyklus (Hall, 2000).



Figur 5.2: Doblingstider for bestrålte relativt til ubestrålte celler ($t_{\text{bestrålt}}/t_{\text{kontroll}}$) for T-47D- og NHIK 3025-celler som funksjon av bestrålingstid, basert på høvesvis forsøka D2-D4 og D5-D7. Cellene vart bestrålt med $[^3\text{H}]\text{-}\beta\text{-stråling}$ frå inkorporert valin med doseratar på 0,015 og 0,013 Gy/time for høvesvis T-47D- og NHIK 3025-cellene. Linjene i diagrammet er funne ved lineærtilpassing.

I tilsvarende doblingstidseksperiment gjort med T-47D-celler (Søvik, 2002) vart det vist ein liten, ikkje signifikant reduksjon i doblingstid i løpet av den andre veka med bestråling. Denne reduksjonen har vorte observert tidlegare også (Hall, 2000) og vert forklart med at cellene reduserer dosebelastninga per generasjon ved å redusere cellesykluslida. Vi ser ikkje ei tilsvarende forkorting av doblingstida i våre eksperiment, men snarare den cellulære responsen til bestrålinga visast som ei auke i doblingstida. Dette kan bety at cellene brukar lenger tid på å passere gjennom cellesyklus eller at ein fraksjon av cellene dør av strålinga for kvar generasjon.

Observasjonar tyder på at den siste forklaringa kan vere rett. I doblingstidsforsøka vart det observert visse skilnader i cellevekst frå koloni til koloni av dei bestrålte cellene. I enkelte koloniar auka celletalet jamt og med om lag same vekstrate som hos kontrollcellene. Den totale reduserte vekstraten kan då kome frå ein kraftig redusert rate i enkelte koloniar, i staden for ein mindre reduksjon i alle koloniane. Det kan då sjå ut til at cellene i koloniane med størst reduksjon i vekstraten, har vorte inaktiverte av strålinga, men likevel er i stand til å gå gjennom cellesyklus nokre gongar, før veksten stansast.

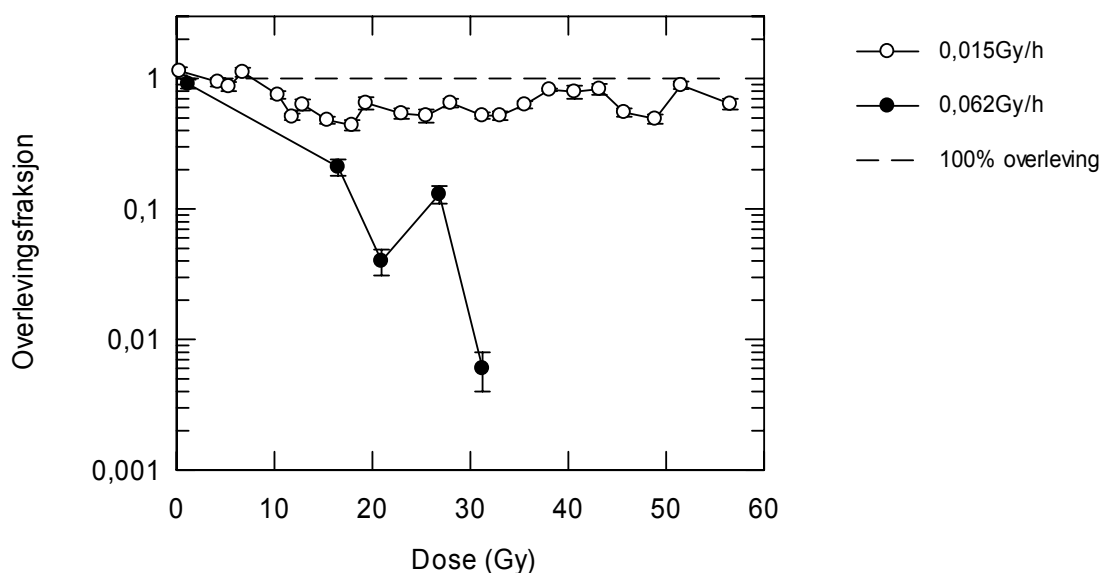
5.3 Celleoverleving

Fraksjonen av celler med evne til å danne koloni som funksjon av dose funne i dette arbeidet viser at både T-47D- og NHIK 3025-cellene tolererer doseraten gjennom heile bestrålingsperioden utan at cellepopulasjonen dør ut. Ein reduksjon i overleving er synleg etter allereie ei veks bestråling og etter eit par veker ser overlevinga ut til å ha stabilisert seg på om lag 60-80 %. Som vist i doblingstidseksperimenta, vart ikkje dei bestrålte cellene stoppa i cellesyklus, men fortsette å dele seg. Denne repopulasjonen fører dermed til at sjølv om ein del celler dør av behandlinga, vil nye celler kome til og kompensere for celledøden. Doblingstida for dei bestrålte cellepopulasjonane vart samla sett likevel lenger enn for ubestrålte cellepopulasjonar.

Der er ei viss spreiding i overleving frå veke til veke. Dette kan blant anna kome av at det er forholdsvis store uvisser knytt til utsåinga av cellene. Det er svært viktig at det vert sådd ut eit nøyaktig tal celler i desse forsøka, sidan dei ubestrålte og bestrålte cellene vart trypsinerte og talte kvar for seg. Det finst metodar som kan gjere dette automatisk, til dømes FACS (*fluorescence-activated cell sorter*). Der nyttar ein eit flowcytometer til å skilje ut og telje enkeltcellene som så vert sådd ut (Marples og Joiner, 1993). I denne oppgåva har vi derimot talt og sådd ut cellene manuelt. Det vart forsøkt å vere nøyaktig for å sikre at ein sådde ut like mengder celler kvar gong frå ein homogen suspensjon av celler. Variasjonen i resultata kan

indikere at talet på utsådde celler har hatt ein viss variasjon gjennom forsøka. Som i forsøka for å bestemme doblingstida, kan cellene også her ha vorte påverka av trypsinering og små variasjonar i trypsin og medium.

Figur 5.3 viser overlevingsfraksjonen funne av Pettersen *et al.* (2005) for T-47D-celler. I det arbeidet vart cellene kontinuerlig bestrålt med ein doserate på 0,015 og 0,062 Gy/time. Bestrålinga vart gjeven ved inkorporert tritiert valin. Vi ser at for den lågaste doseraten visast også her ein reduksjon i høve til 100 % overleving, men cellene opprettheld ei overleving på om lag 60-70 %. Dette resultatet stemmer bra overeins med resultata frå overlevingsforsøka i denne oppgåva.

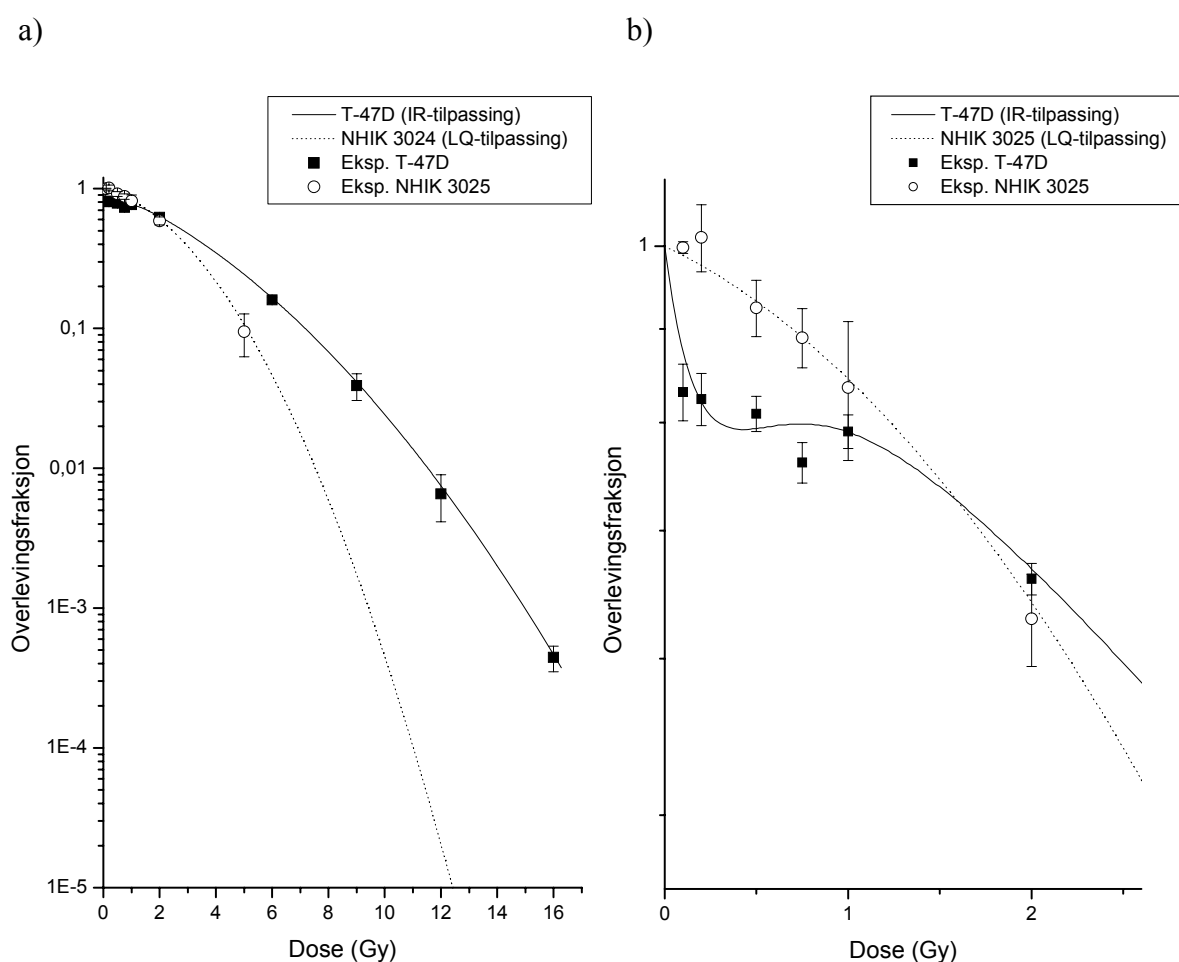


Figur 5.3: Overlevingsfraksjon som funksjon av stråledose for T-47D-celler bestrålt med $[^3\text{H}]\text{-}\beta$ -stråling frå inkorporert valin ved to ulike doseratar (Pettersen *et al.*, 2005, figuren er modifisert).

Det ser ikkje ut til å vere nokon skilnad i celleoverleving mellom dei to celletypene som er undersøkt i den oppgåva. Figur 5.4 viser overlevingsfraksjonar til T-47D og NHIK 3025 (Jeppesen Edin, 2003). I dette eksperimentet vart cellene bestrålte med låg-LET høgdoseratestråling (omlag 50 Gy/time, akutt bestråling) frå ei koboltkjelde (^{60}Co). ^{60}Co sender ut to foton med energiane 1,17 og 1,33 MeV i kvar desintegrasjon (Attix, 1986). Det er gjort tilpassingar til overlevingsdata til to ulike modellar, LQ-modellen (*linear quadratic*) (Sinclair, 1966) og IR-modellen (*induced repair*) (Joiner og Johns, 1988). Vi ser at overlevingsfraksjonen til NHIK 3025-cellene er mykje lågare enn overlevingsfraksjonen for

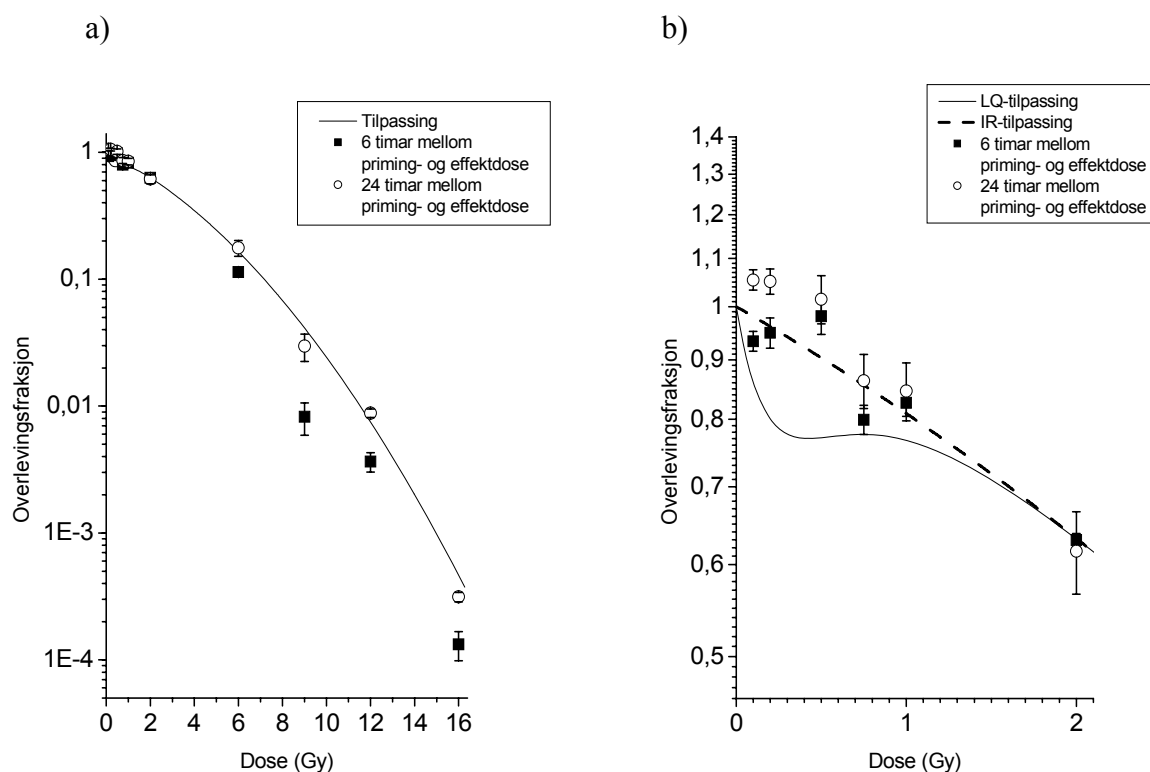
T-47D-cellene ved dei høge dosane ved høgdozeratebestråling. Dette viser at dei to celletypene reagerer ulikt på høgdozeratebestråling, medan våre eksperiment viser at dei reagerer nokså likt ved låge doseratar.

Figur 5.4 b) viser overlevingsfraksjonen for dei to celletypene i doseområdet 0-2 Gy. Vi ser tydeleg at T-47D-cellene viser hypersensitivitet og indusert stråleresistens ved dei lågaste dosane, medan NHIK 3025-cellene ikkje viser ein slik effekt (Jeppesen Edin, 2003). Ved ein lågare doserate er det forventta at celleoverlevinga følgjer den initielle hellinga på overlevingskurva. Om så var tilfelle, ville det føre til ein stor skilnad i overleving mellom dei to celletypene vi har undersøkt.



Figur 5.4: Overlevingsfraksjon som funksjon av dose for T-47D- og NHIK 3025-celler. Datapunkta viser gjennomsnittleg celleoverleving frå tre uavhengige forsøk for T-47D- og NHIK 3025-celler, medan kurvene viser ulike tilpassingar til data. a) Alle data. b) Data opp til 2 Gy (Jeppesen Edin, 2003, figuren er modifisert).

Figur 5.5 viser overlevingsfraksjonen til T-47D-celler som har fått ein liten primingdose på 0,3 Gy med doseraten 0,3 Gy/time 6 og 24 timar før effektdosen (Jeppesen Edin *et al.*, 2005). Vi ser at denne primingdosen har oppheva hypersensitiviteten og at celleoverlevinga i doseområdet 0-1 Gy er høgare enn for celler som ikkje har fått primingdose. I våre eksperiment ser vi ikkje særskilt endring i overlevingsfraksjon mellom dei låge og dei høgare dosane. Resultata tyder derfor på at den låge doseraten nytta er nok til å oppheve hypersensitiviteten for T-47D-cellene.



Figur 5.5: Overlevingsfraksjon som funksjon av dose for T-47D-celler. Datapunkta viser gjennomsnittleg celleoverleving for T-47D-celler frå 6 uavhengige forsøk som funksjon av effektdose etter ein primingdose på 0,3 Gy med den låge doseraten 0,3 Gy/time, med 6 og 24 timar mellom priming- og effektdose. Kurvene viser ulike tilpassingar til data frå T-47D-celler som har vorte bestrålt med ein enkelt akuttdose. a) Alle data. b) Data frå 0-2 Gy (Jeppesen Edin *et al.*, 2005, figuren er modifisert).

Furre *et al.* har gjort lågdoserateeksperiment med både T-47D-celler (2003) og NHIK 3025-celler (1999). I desse arbeida vart cellene bestrålt med låg-LET ^{60}Co -stråling ved ulike låge doseratar. Desse doseratane var 0,94 og 0,37 Gy/time for T-47D-cellene og 0,86 og 0,33 Gy/time for NHIK 3025-cellene. Eksperimenta viste ein invers doserateeffekt hos NHIK 3025-cellene mellom doseratane 0,33 Gy/time og 0,86 Gy/time, det vil seie at

overlevingsfraksjonen var lågare når cellene vart bestrålte med den lågaste doseraten. Dette var ikkje tilfelle for T-47D-cellene, der viste den lågaste doseraten ein redusert biologisk effekt, då celleoverlevingsfraksjonen vart høgare ved ein senka doserate. Det vart altså også her vist ein skilnad i cellulær respons mellom dei to celletypene som vi ikkje observerer i våre data.

I eksperimenta skildra over vart det nytta ^{60}Co -stråling i både høg- og lågdoserateeksperiment med T-47D- og NHIK 3025-celler. Monte Carlo-simuleringar av energiavsetjingsmønsteret til foton med ulike energiar og tritium, har vist at elektrona frå tritium er meir effektive i å danne høgare ordens (med omsyn på talet på ionisasjonar) ”klynger” (*clusters*) av ionisasjonar enn foton med energi over 100 keV, men energiavsetjinga frå tritium liknar energiavsetjinga frå foton med energi under 100 keV. Den romlege fordelinga av klynger liknar den frå foton med ein energi på om lag 70 keV (Moiseenko *et al.*, 1997). Klynger av ionisasjonar i DNA reknast å vere viktig for den biologiske responsen i bestrålte celler (Goodhead, 1994) og simuleringar av dobbeltrådbrot i DNA antyder ei lita auke i utbyte av dobbeltrådbrot for 70 keV og β -partiklar i høve til foton med ein energi på 660 keV (frå ^{137}Cs). Denne auka er tydelegare for komplekse dobbeltrådbrot (Moiseenko *et al.*, 1998). Den relative biologiske effektiviteten til tritium og 70 keV foton med omsyn på dobbeltrådbrot og med ^{137}Cs som referansestråling er likevel ikkje mykje større enn 1 (Moiseenko *et al.*, 1998). Dersom ein går ut i frå at der er ein samanheng mellom energiavsetjing og biologisk respons, er det då ingen grunn til å tru at γ -strålinga frå ^{60}Co er meir effektiv til å inaktivere celler enn β -strålinga frå tritium (Søvik, 2002). Vi kan derfor gå ut i frå at det er den reduserte doseraten nytta i den føreliggjande oppgåva som er årsaka til den auka celleoverlevinga vi observerer i våre resultat i høve til resultata frå dei andre lågdoseratestudiane.

Cellene som har vorte bestrålte i fleire veker, har mottatt ein svært stor stråledose. Det at celleoverlevinga er stabil på eit relativt høgt nivå i løpet av desse vekene, kan kome av at alle stråleskadane vert reparert. Ein skulle likevel tru at dei store dosane ville gje svært mange skader og reparasjon av alle desse vil vere vanskelig. Den relativt høge overlevingsfraksjonen kan då forklarast utifrå bystandereffekten og genetisk instabilitet (Morgan, 2002). Vi observerte at i enkelte koloniar var celleveksten dårlegare enn i andre. Ein kan spekulere i om dette kan kome av at visse celler tek på seg all effekten av strålinga og desse vert ofra til gode for resten av populasjonen. Fleire mekanismar er mogelege, men det er enklast å tenkje seg at majoriteten av skadane går til ei dottercelle, medan den andre dottercella vert så og seie skadefri. Det er og mogeleg at ein kombinasjon av reparasjon av stråleskadane og bystandereffekt/genomisk instabilitet er årsaka til at cellene tolererer dei høge dosane så lenge doseraten er låg nok. Mekanismen bak bystandereffektar er førebels uklar (Lyng *et al.*, 2002).

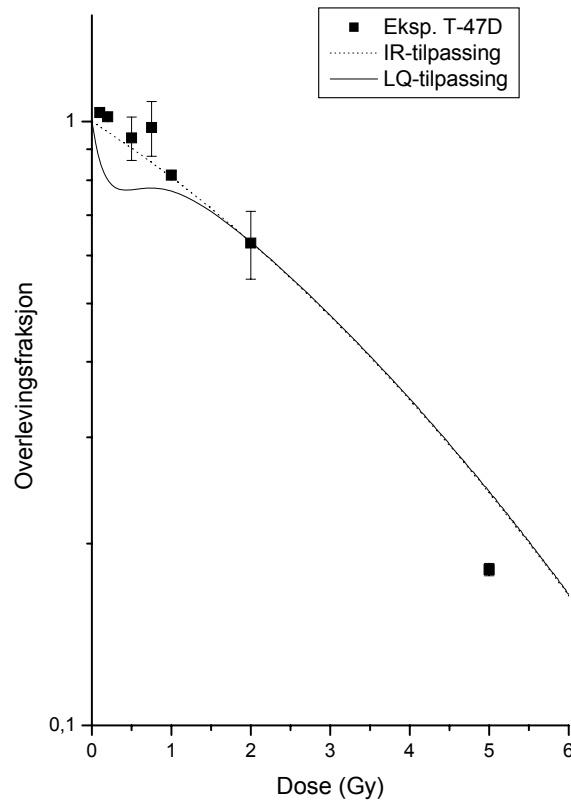
5.4 Cellesyklusfordeling

Flowcytometriundersøkingane av DNA-innhaldet i cellene viste ingen endringar i cellesyklusfordelingane i løpet av forsøka (figur 4.15). Dette indikerer at cellene ikkje vart stoppa i noko kontrollpunkt, men såg ut til å kunne gå gjennom cellesyklus som vanleg.

Furre *et al.* (1999, 2003) viste at både T-47D- og NHIK 3025-cellene vert arrestert i G₂-fase ved låg-LET ⁶⁰Co-bestråling med ulike låge doseratar, høvesvis 0,94 og 0,37 Gy/time for T-47D-cellene og 0,86 og 0,33 Gy/time for NHIK 3025-cellene. Desse doseratane er høgare enn doseratane nytta i føreliggjande oppgåve, vi kan derfor gå ut i frå at doseratane nytta her er så låge at det ikkje vart indusert nokon permanent G₂-arrest i cellene, men at dei fortsette gjennom cellesyklus.

Doseratane vi nytta, førte til oppheving av hypersensitiviteten til T-47D-cellene. Ein skulle dermed ha forventa å få ei opphoping av celler i G₂- fase, sidan ein trur at hypersensitivitet kjem av at cellene får passere kontrollpunktet på slutten av G₂-fase for å gå i mitose med skader og døy (Marples *et al.*, 2003).

Figur 5.6 viser ei celleoverlevingskurve for T-47D-celler (Jeppesen Edin, 2003). Desse cellene har vorte bestrålte på førehand av inkorporert tritium. Denne bestrålinga vart gjeven med ein doserate på 0,01 Gy/time i fleire månader, til totaldosar på 24,7 og 36,2 Gy. Cellene vart så bestrålte med ⁶⁰Co-akuttbestråling. Vi ser av figuren at førbehandlinga med tritium gjer at cellene ikkje viser hypersensitivitet.



Figur 5.6: Overlevingsfraksjon som funksjon av effektdose for T-47D-celler. Punkta representerer data frå to separate forsøk med celler som har vorte bestrålt på førehand med inkorporert valin ved ein doserate på 0,01 Gy/time i fleire månader. Den stipla linja viser IR-tilpassing til datapunkta, medan den heiltrukne linja viser LQ-tilpassing til data for T-47D-celler bestrålte med berre ein akutt-dose (Jeppesen Edin, 2003, figuren er modifisert).

Sjølv om vi i våre eksperiment ikkje ser noko permanent opphoping av celler i G_2 -fase, kan cellene likevel ha vorte stoppa der. Xu *et al.* (2002) har vist at det finst to kontrollpunkt i G_2 -fase. Eit kontrollpunkt finst i slutten av fasen, der det vert avgjort om DNA-syntesen var vellukka før cella sleppast inn i M-fase. Det andre kontrollpunktet er tidlegare i G_2 -fasen, det vert aktivert rett etter bestråling og varer i 1-2 timar. Kontrollpunktet er ATM-avhengig og er inaktivt ved dosar under 0,4 Gy (Marples *et al.*, 2003). Sidan dette kontrollpunktet er så kortvarig, vil det ikkje visast noko endring i cellyklusfordelinga når denne undersøkjast ved flowcytometri.

6 Konklusjon

I denne oppgåva har vi undersøkt responsen til T-47D- og NHIK 3025-celler på bestråling med ultralåg doserate. Cellene vart bestrålte av inkorporert tritium og doseratane som vart nytta var 0,015 Gy/time for T-47D-cellene og 0,013 Gy/time for NHIK 3025-cellene.

Alle eksperimenta viser at begge celletypene tolererer strålinga og kan oppretthalde proliferasjon utan å døy ut. Nokre effektar av strålinga er likevel synlege.

Doblingstider vart funne frå kurver av celletal som funksjon av tid og det vert observert ei auke i doblingstidene til dei bestrålte cellene utover i forsøka. Doblingstidsresultata antyder også at T-47D-cellene viser ei større auke i doblingstid enn NHIK 3025-cellene. Denne skilnaden kan kome av dei ulike absolutte doblingstidene til dei to celletypene.

Både T-47D- og NHIK 3025-cellene viser ein reduksjon i celleoverleving ved bestråling ved dei ultralåge doseratane. Overlevingsfraksjonen minkar i løpet av dei fyrste bestrålingsvekene til om lag 60-80 %. Det kjem ikkje fram nokon skilnad i respons mellom dei to celletypene i våre eksperiment. Sidan T-47D-celler viser hypersensitivitet for låge stråledosar ved akuttbestråling ($< 0,5$ Gy) medan NHIK 3025-cellene ikkje gjer det, tyder dette på at bestrålinga nytta i føreliggjande oppgåve opphevar hypersensitiviteten.

Det vert ikkje observert noko tydeleg endring i fordelinga av celler i dei ulike fasane av cellesyklus i løpet av bestrålinga. Dette tyder på at opphevinga av hypersensitivitet i T-47D-cellene ikkje kjem av ein permanent arrest i G_2 -fase. Cellene kan likevel ha vorte stoppa i meir kortvarige kontrollpunktet tidlegare i fasen, utan at ein kan sjå dette utifrå cellesyklusfordelingane.

Referansar

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2002. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. Garland Science, New York.

Attix, F. H., 1986. *Introduction to Radiological Physics and Radiation Dosimetry*. John Wiley & Sons, New York.

Bakkenist, C. J. og Kastan, M. B., 2003. *DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation*. Nature, 421, 499-506.

Banin, S., Moyal, L., Shieh, S-Y., Taya, Y., Anderson, C. W., Chessa, L., Smorodinsky, N. I., Prives, C., Reiss, Y., Shiloh, Y. og Ziv, Y., 1998. *Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage*. Science, 281, 1674-1677.

Canman, C. E., Lim, D-S., Cimprich, K. A., Taya, Y., Tamai, K., Sakaguchi, K., Apella, E., Kastan, M. B. og Siliciano, J. D., 1998. *Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53*. Science, 281, 1677-1679.

Casey, G., Lo-Hsueh, M., Lopez, M. E., Vogelstein, B. og Stanbridge, E. J., 1991. *Growth suppression of human breast cancer cells by the introduction of a wild-type p53 gene*. Oncogene, 6, 1791-1797.

Chadwick, K. H. og Leenhouts, H. P., 1973. *A molecular theory of cell survival*. Physics in Medicine and Biology, 18, 78-87.

Dertinger, H. og Jung, H., 1970. *Molecular Radiation Biology*. Springer-Verlag, Berlin · Heidelberg.

DeWeese, T. L., Shipman, J. M., Dillehay, L. E., Nelson, W. G., 1998. *Sensitivity of human prostatic carcinoma cell lines to low dose rate radiation exposure*. The Journal of Urology, 159, 591-598.

Feinendegen, L. E., 1967. *Tritium-Labeled Molecules in Biology and Medicine*. Academic Press Inc., New York.

Furre, T., Eggen Furre, I., Koritzinsky, M., Åmellem, Ø. og Pettersen, E. O., 2003. *Lack of inverse dose-rate effect and binding of the retinoblastoma gene product in the nucleus of human cancer T-47D cells arrested in G2 by ionizing radiation*. International Journal of Radiation Biology, 79, 413-422.

Furre, T., Koritzinsky, M., Olsen, D.R. og Pettersen, E. O., 1999. *Inverse dose-rate effect due to pre-mitotic accumulation during continuous low dose-rate irradiation of cervix carcinoma cells*. International Journal of Radiation Biology, 75, 699-707.

Goddu, S. M., Howell, R. W., Bouchet, L. G., Bolch, W. E. og Rao, D. V., 1997. *MIRD Cellular S Values. Self-absorbed dose per unit cumulated activity for selected radionuclides and monoenergetic electron and alpha particle emitters incorporated into different cell compartments*. Society of Nuclear Medicine, Reston.

Goodhead, D. T., 1994. *Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA*. International Journal of Radiation Biology, 65, 7-17.

Hall, E. J., 2000. *Radiobiology for the Radiologist*. 5th edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

Harrington, E. A., Bruce, J. L., Harlow, E. og Dyson, N., 1998. *pRB plays an essential role in cell cycle arrest induced by DNA damage*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95, 11945-11950.

Henriksen, E. K. og Henriksen T., 1998. *Vår strålende verden: radioaktivitet, røntgestråling og helse. Temahefte 2*. Fysisk institutt, UiO, Oslo.

Hill, R. L. og Johnson, J. R., 1993. *Metabolism and dosimetry of tritium*. Health Physics, 65, 628-647.

International Commission on Radiatomi Protection (ICRP), 1983. *Radionuclide transformations: Energy and intensity of emissions*. ICRP Publication 38, Pergamon Press, New York.

International Commission on Radiation Units and Measurements (ICRU), 1980. *Radiation quantities and units*. ICRU Report 33, ICRU, Maryland.

Jackson, S. P., 2002. *Sensing and repairing DNA double-strand breaks*. Carcinogenesis, 23, 687-696.

- Jeppesen Edin, N. F., 2003. *Hyper-radiosensitivity and induced radioresistance (HRS/IRR). The effects of using different dose-rates for pre-exposure on the hyper-radiosensitivity in T-47D cells*. Cand. scient. oppgåve, Universitetet i Oslo.
- Jeppesen Edin, N. F., Olsen, D. R., Stokke, T. og Pettersen, E. O., 2005. *Recovery of low-dose hyper-radiosensitivity following a small priming dose depends on priming dose-rate*. International Journal of Low Radiation, innsendt.
- Joiner, M. C. og Johns, H., 1988. *Renal damage in the mouse: The response to very small doses per fraction*. Radiation Research, 114, 385-398.
- Joiner, M. C., Marples, B., Lambin, P., Short, S. C. og Turesson, I., 2001. *Low-dose hypersensitivity: Current status and possible mechanisms*. International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics, 49, 379-389.
- Khan, F. M., 1994. *The Physics of Radiation Therapy*. 2nd edition. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore.
- Keydar, I., Chen, L., Karby, S., Weiss, F. R., Delarea, J., Radu, M., Chaitcik, S. og Brenner, H. J., 1979. *Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin*. European Journal of Cancer, 15, 659-670.
- Kielberg, V., Brünner, N., Briand, P., 2001. *Celledyrkning. En praktisk håndbog i dyrkning af mammalske celler*. Gads Forlag, København.
- L'Annunziata, M.F., 1987. *Radionuclide Tracers. Their Detection and Measurement*. Academic Press Inc., London.
- Lyng, F. M., Seymour, C. B. og Mothersill, C., 2002. *Initiation of apoptosis in cells exposed to medium from the progeny of irradiated cells: a possible mechanism for bystander-induced genomic instability?* Radiation Research, 157, 365-370.
- Marin, L. A., Smith, C. E., Langston, M. Y., Quashie, D. og Dillehay, L. E., 1991. *Response of glioblastoma cell lines to low dose rate irradiation*. International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics, 21, 397-402.
- Marples, B., 2004. *Is low-dose hyper-radiosensitivity a measure of G2-phase cell radiosensitivity?* Cancer and Metastasis, 23, 197-207.

- Marples, B. og Joiner, M. C., 1993. *The response of Chinese hamster V79 cells to low radiation doses: Evidence of enhanced sensitivity of the whole cell population*. Radiation Research, 133, 41-51.
- Marples, B. og Joiner, M. C., 1995. *The elimination of low-dose hypersensitivity in Chinese hamster V79-379A cells by pretreatment with X-rays or hydrogen peroxide*. Radiation Research, 141, 160-169.
- Marples, B., Wouters, B. G. og Joiner, M. C., 2003. *An association between the radiation-induced arrest of G₂-phase cells and low-dose hyper-radiosensitivity: a plausible underlying mechanism?* Radiation Research, 160, 38-45.
- Mitchell, C. R., Folkard, M. og Joiner, M. C., 2002. *Effects of exposure to low-dose-rate ⁶⁰Co gamma rays on human tumor cells in vitro*. Radiation Research, 158, 311-318.
- Mitchell, J. B., Bedford, J. S. og Bailey, S. M., 1979. *Dose-rate effects on the cell cycle and survival of S3 HeLa and V79 cells*. Radiation Research, 79, 520-536.
- Moiseenko, V. V., Hamm, R. N., Waker, A. J. og Prestwich, W. V., 1998. *Modelling DNA damage induced by different energy photons and tritium beta-particles*. International Journal of Radiation Biology, 74, 533-550.
- Moiseenko, V. V., Walker og A. J., Prestwich, W. V., 1997. *Energy deposition patterns from tritium and different energy photons – a comparative study*. Health Physics, 73, 388-392.
- Morgan, W. F, 2002. *Genomic instability and bystander effects: A paradigm shift in radiation biology?* Military Medicine, 167, 44-45.
- Morstin, K., Kopec, M., Olko, P., Schmitz, T. og Feinendegen, L. E., 1993. *Microdosimetry of tritium*. Health Physics, 65, 648-656.
- Mothersill, C. og Seymour, C., 1997. *Medium from irradiated human epithelial cells but not human fibroblasts reduces the clonogenic survival of unirradiated cells*. International Journal of Radiation Biology, 71, 421-427.
- Nias, A. H. W., 1998. *An introduction to Radiobiology*. 2nd edition, John Wiley & Sons Ltd, Chichester.

Nikjoo, H., Goodhead, D. T., Charlton, D. E. og Paretzke, H. G., 1991. *Energy deposition in small cylindrical targets by monoenergetic electrons*. International Journal of Radiation Biology, 60, 739-756.

Oftebro, R., og Nordbye, K., 1969. *Establishment of four new cell strains from human uterine cervix. II*. Experimental Cell Research, 58, 459-460.

Packard Instrument Company, 1995. *Tri-Carb® Liquid Scintillation Analyzers Models 2100TR/2300TR Operation manual*. Packard Instrument Company, Meriden.

Palmer, G. M., Keely, P., J., Breslin, T., M. og Ramanujam, N., 2003. *Autofluorescence spectroscopy of normal and malignant human breast cell lines*. Photochemistry and Photobiology, 78, 462-469.

Petcu, I., Moiso, N., Savu, D. og Constantinescu, B., 2002. *Effect of pre-exposure to β rays of tritium some biochemical parameters measured in organs of rats subsequently irradiated with fast neutrons*. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 80, 742-749.

Pettersen, E. O., Bjørhovde, I., Søvik Å., Edin, N. F. J., Zachar, V., Hole, E. O. og Ebbesen, P., 2005. *Chronic hypoxia may radiosensitize cancer cells for low dose-rate irradiation*. I manuskriptform.

Pouget, J-P. og Mather, S. J., 2001. *General aspects of the cellular response to low- and high-LET radiation*. European Journal of Nuclear Medicine, 28, 541-561.

Radford, I. R., 2002. *DNA lesion complexity and induction of apoptosis by ionizing radiation*. International Journal of Radiation Biology, 78, 457-466.

Radiumhospitalet: informasjon om kreft. Tilgjengeleg frå http://www.radiumhospitalet.no/Norsk/Pasienter_og_parorende/Informasjon_om_kreft/ [sist besøkt 16. des 2005].

Rothkamm, K., Krüger, I., Thompson, L. H. og Löbrich, M., 2003. *Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle*. Molecular and Cellular Biology, 23, 5706-5715.

Rowberg, R. E., 2001. *RL30425: The department of energy's tritium production program* [online]. CRS Report for Congress. National Council for Science and the Environment, Washington. Tilgjengeleg frå: <http://www.cnie.org/nle/crsreports/energy/eng-31.pdf> [sist besøkt 16. des 2005].

Rønning, Ø. W., Pettersen, E. O. og Seglen, P. O., 1979. *Protein synthesis and protein degradation through the cell cycle of human NHIK 3025 cells in vitro*. Experimental Cell Research, 123, 63-72.

Savitsky K., Bar-Shira A., Gilad S., 1995. *A single Ataxia Telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase*. Science, 268, 1749-1753.

Sinclair, W. K., 1966. *The shape of radiation survival curves of mammalian cells cultured in vitro*. I: *Biophysical Aspects of Radiation Quality* (Technical Report Series No. 58), International Atomic Energy Agency, Wien.

Squires, G. L., 1985. *Practical physics*. 3rd edition. Cambridge University Press, Cambridge.

Steen, H. B. og Lindmo, T., 1978. *Cellular and nuclear volume during the cell cycle of NHIK 3025 cells*. Cell Tissue Kinetics, 11, 69-81.

Stokke, T., Erikstein, B. K., Smedshammer, L., Boye, E. og Steen, H. B., 1993. *The retinoblastoma gene product is bound in the nucleus in early G₁ phase*. Experimental Cell Research, 204, 147-155.

Straume, T. og Carsten, A. L., 1993. *Tritium radiobiology and relative biological effectiveness*. Health Physics, 65, 657-672.

Swallow, A. J., 1973. *Radiation Chemistry*. Longman Group Limited, London.

Søvik, Å., 2002. *Lavdoseratebestråling av humane celler i kultur. Dosimetri og effektmålinger*. Cand. scient. oppgave, Universitetet i Oslo.

Xu, B., Kim, S-T., Lim, D-S og Kastan, M., 2002. *Two molecularly distinct G₂/M checkpoints are induced by ionizing irradiation*. Molecular and Cellular Biology, 22, 1049-1059.

Zhang, X. og Kiechle, F. L., 1997. *Hoechst 33342-induced apoptosis in BC3H-1 myocytes*. Annals of Clinical and Laboratory Science, 27, 260-275.

Åmellem, Ø., Stokke, T., Sandvik, J. A., Smedshammer, L. og Pettersen, E. O., 1997. *Hypoxia-induced apoptosis in human cells with normal p53 status and function, without any alteration in the nuclear protein level.* Experimental Cell Research, 232, 361-370.

Åmellem, Ø., Sandvik, J. A., Stokke, T. og Pettersen, E. O., 1998. *The retinoblastoma protein-associated cell cycle arrest in S-phase under moderate hypoxia is disrupted in cells expressing HPV18 E7 oncoprotein.* British Journal of Cancer, 77, 862-872.

Appendiks A: Geometrisk reduksjonsfaktor og uttrykk for bremseevne

Dei geometriske reduksjonsfaktorane og uttrykka for bremseevne er henta frå Goddu et al. 1997.

A.1 Geometriske reduksjonsfaktorar

$$\psi_{N \leftarrow Cy}(x) = \begin{cases} Qx^2 \left(R_N^2 - \frac{1}{12}x^2 \right) & \begin{array}{l} \text{når } R_C \leq 3R_N \text{ og } 0 \leq R_C - R_N \\ \text{eller når } R_C \geq 3R_N \text{ og } 0 \leq x \leq 2R_N \end{array} \\ Q \left[\frac{1}{2}(R_C^2 - R_N^2)(R_N^2 - x^2) + \frac{2x}{3}(R_C^3 - R_N^3) - \frac{1}{4}(R_C^4 - R_N^4) \right] & \text{når } R_C \leq 3R_N \text{ og } R_C - R_N \leq x \leq 2R_N \\ \frac{R_N^3}{R_C^3 - R_N^3} & \text{når } R_C \geq 3R_N \\ \frac{Q}{12} [x^4 - 3(R_C^4 + R_N^4) + 6(R_C^2 R_N^2 - x^2 R_N^2 - x^2 R_C^2) + 8x(R_C^3 + R_N^3)] & \begin{array}{l} \text{når } R_C \leq 3R_N \text{ og } 2R_N \leq x \leq R_C + R_N \\ \text{eller når } R_C \geq 3R_N \text{ og } R_C - R_N \leq x \leq R_C + R_N \end{array} \\ 0 & \end{cases}$$

$$\text{der } Q = \frac{3}{4x(R_C^3 - R_N^3)} \quad (\text{A.1})$$

$$\psi_{N \leftarrow N}(x) = \begin{cases} 1 - \frac{3}{4} \left(\frac{x}{R_N} \right) + \frac{1}{16} \left(\frac{x}{R_N} \right)^3 & \text{når } 0 \leq x \leq 2R_N \\ 0 & \text{når } x > 2R_N \end{cases} \quad (\text{A.2})$$

A.2 Uttrykk for bremseevne

Uttrykka nedanfor viser samanhengen mellom elektronenergi E og elektronrekkevidde X i medium med tettheit $1,0 \text{ g/cm}^3$ for ulike elektronenergier.

0,4 keV – 20 keV:

$$E = 5,9(X + 0,007)^{0,565} + 0,00413 X^{1,33} - 0,367 \quad (\text{A.3})$$

$$\frac{dE}{dX} = 3,333(X + 0,007)^{-0,435} + 0,0055 X^{0,33} \quad (\text{A.4})$$

0,06 keV – 0,4 keV:

$$X = 1,524 \times 10^{-3} + 3,815 \times 10^{-2} E - 7,018 \times 10^{-4} E^2 + 3,628 \times 10^{-2} E^3 \quad (\text{A.5})$$

$$\frac{dE}{dX} = 29,5 - 666,7 X \quad (\text{A.6})$$

0 – 0,06 keV:

$$X = 0,0123 E + 2,25 E^2 - 23,33 E^3 \quad (\text{A.7})$$

$$\frac{dE}{dX} = 10,5 + 1,126 \times 10^3 X - 9,251 \times 10^5 X^2 + 2,593 \times 10^8 X^3 + 4,964 \times 10^{10} X^4 \quad (\text{A.8})$$

Appendiks B: Cellulære S-verdiar

I tabell B.1 er dei cellulære S-verdiane $S(N \leftarrow N)$ og $S(N \leftarrow Cy)$ for tritium, henta frå Goddu *et al.* (1997), gjevne for ulike kombinasjonar av celle- og kjerneradiar. S-verdiane $S(C \leftarrow C)$, $S(C \leftarrow CS)$ og $S(N \leftarrow CS)$ er ikkje viste, då dei ikkje inngår i den dosimetriske berekningsmodellen i denne oppgåva.

Tabell B.1: Cellulære S-verdiar (Goddu et al., 1997, tabellen er modifisert).

R_C (μm)	R_N (μm)	$S(N \leftarrow N)$ (Gy/Bq s)	$S(N \leftarrow Cy)$ (Gy/Bq s)
3	2	1,56E-02	2,99E-03
3	1	8,16E-02	4,25E-03
4	3	5,58E-03	1,20E-03
4	2	1,56E-02	1,46E-03
5	4	2,61E-03	5,84E-04
5	3	5,58E-03	6,36E-04
5	2	1,56E-02	8,01E-04
6	5	1,43E-03	3,25E-04
6	4	2,61E-03	3,26E-04
6	3	5,58E-03	3,74E-04
7	6	8,61E-04	1,99E-04
7	5	1,43E-03	1,87E-04
7	4	2,61E-03	1,99E-04
7	3	5,58E-03	2,35E-04
8	7	5,58E-04	1,30E-04
8	6	8,61E-04	1,17E-04
8	5	1,43E-03	1,18E-04
8	4	2,61E-03	1,30E-04
9	8	3,82E-04	8,97E-05
9	7	5,58E-04	7,77E-05
9	6	8,61E-04	7,51E-05
9	5	1,43E-03	7,86E-05
10	9	2,73E-04	6,44E-05
10	8	3,82E-04	5,42E-05
10	7	5,58E-04	5,07E-05
10	6	8,61E-04	5,10E-05
10	5	1,43E-03	5,50E-05

Appendiks C: Kjemikalieliste

Nedanfor er alle kjemikalia som vart nytta under laboratoriearbeidet lista opp i alfabetisk rekkjefølgje, med tilhøyrande produsent eller leverandør.

Kjemikalie

DTT (dithiothreiol)
 EDTA (etylenediaminetertraacetic acid)
 Emulsifier-Safe® scintillajsonsteljevæske
 Etanol (C₂H₅OH), 96 %
 Fenolraudt
 Føtalt kalveserum
 Glukose
 Glycerofosfat (C₃H₇O₆PNa₂)
 Hepes
 Hoechst 33258 (624 µg/ml)
 Hoechst 33342 (562 µg/ml)
 Insulin
 KCl
 L-Glutamin (C₅H₁₀N₂O₃)
 L-Valin (C₅H₁₁NO₂)
 L-[3,4(n)-³H]-valin
 MEM-pulver med Hanks
 Metylenblått
 MgCl₂
 Milli-Q-vatn
 NaCl
 NaDOC
 NaHCO₃
 NaOH
 NaVO₃
 PCA (perchloric acid)
 PBS
 Penicillin-Streptomycin (5000 IU/ml-5000 µg/ml)
 RPMI-pulver med L-Glutamin
 RPMI stamløysing
 Triton X-100
 Trypsinpulver

Produsent/leverandør

Sigma (USA)
 Fluka (Sveits)
 Packard BioScience (Nederland)
 Arcus AS (Oslo)
 Merck (Tyskland)
 Euroclone (Storbritannia)
 Sigma (USA)
 Sigma (USA)
 Sigma (USA)
 Riedel de Haën (Tyskland)
 Riedel de Haën (Tyskland)
 Sigma (USA)
 Merck (Tyskland)
 Sigma (USA)
 Sigma (USA)
 Amersham LifeScience (England)
 Gibco (Skottland)
 Merck (Tyskland)
 Merck (Tyskland)
 Millipore (USA)
 Riedel de Haën (Tyskland)
 Sigma (USA)
 Norsk medisinaldepot (Oslo)
 Merck (Tyskland)
 Sigma (USA)
 Merck (Tyskland)
 Euroclone (Storbritannia)
 Euroclone (Storbritannia)
 JHR Biosciences (USA)
 Euroclone (Storbritannia)
 Bio-rad (USA)
 Roche (Tyskland)

Appendiks D: Oppskrifter

RPMI 1640 medium

Pr. liter stamløysing:

RPMI 1640-pulver	10,43 g
NaHCO ₃	2,00 g
Milli-Q H ₂ O	1,0 l

Pr. liter fullmedium (med serum):

RPMI stamløysing	880 ml
Føtalt kalveserum (10%)	100 ml
Penicillin/streptomycin	10 ml
Insulin (200 einingar/l)	2 ml
L-Glutamin	10 ml

MEM medium

Pr. liter stamløysing:

MEM-pulver:	10,63 g
NaCO ₃	2,4 g
Milli-Q H ₂ O	1,0 l

Pr. liter fullmedium (med serum):

MEM stamløysing	810 ml
Føtalt kalveserum (10%)	150 ml
Penicillin/streptomycin	20 ml
L-Glutamin	10 ml

Kald valin

82,9 mM løysing:

L-Valinpulver	1,00 g
RPMI stamløysing	103 ml

Trypsin

Pr. liter stamløysing:

NaCl	8,00 g
KCl	0,40 g
Glukose	1,00 g
NaHCO ₃	0,35 g
Fenolraudt	0,02 g
Milli-Q H ₂ O	1,0 l

Pr. liter trypsin med EDTA:

Trypsin stamløysing	1,0 l
EDTA-pulver	200 mg
Trypsinpulver	500 mg

Pr. liter trypsin (puck):

Trypsin stamløysing	1,0 l
Trypsinpulver	500 mg

L-Glutamin, 35 ml

L-Glutamin	1,0227 B
RPMI stamløysing	35 ml

PBS

Pr. liter løysing:

NaCl	8,000 g
KCl	0,201 g
KH ₂ PO ₄	0,204 g
Na ₂ HPO ₄ •12H ₂ O	2,858 g
Milli-Q H ₂ O	1,0 l

Hepes 1M

2,38 g Hepes løysast i 10 ml MQ H₂O,
justerast til pH 7,9 (med rein HCl eller 40% NaOH) og sterilfiltrerast.

Buffer A

10 ml:

Hepes 1 M pH 7,9	0,1 ml
NaVO ₃	0,0012 g
DTT	0,001 g
Triton X-100	10 µl
MgCl ₂	0,003 g
KCl	0,0075 g
Glycerofosfat	0,02 g
MQ H ₂ O	10 ml

Appendiks E: Radioaktivitet

Vi ønskte i dette arbeidet å bruke medium med ein aktivitet på 0,25 mCi per 150 ml medium. Den tritierte valinen kom i små flasker med konsentrasjon på 1,0 mCi/ml. Desse vart kjøpt i 1997 og tritiumen har desintegrert sidan då, halveringstida er relativt kort på 12,32 år. Berekningar gjort av Pål Graff i juli 2002 viste ein aktivitet på tritiumen på 0,54 mCi/ml.

For å halde den spesifikke aktiviteten konstant, vart det tilsett 1.5 ml kald (ikkje radioaktiv) valin i konsentrasjon 82,9 mM til mediet, slik at ein fekk ein endeleg konsentrasjon av valin i mediet på 1,0 mM. Dette gjev ein spesifikk aktivitet i dei radioaktive media:

$$S = \frac{0,25mCi}{1,0mM \times 0,1520l} = 1,6Ci / mol$$

Aktiviteten per volumeining etter berekningane frå 2002, vert dermed:

$$A_v = \frac{0,25mCi \times 37MBq / mCi}{151,96ml} = 6,09 \times 10^4 Bq / ml$$

Berekningar med omsyn til desintegrasjon av tritium frå juli 2002 til august 2003

Eksperimenta vart starta i august 2003. Desintegrasjonen til tritium fører til at vi må forvente å måle ein lågare aktivitet per volumeining enn den berekna over.

Aktiviteten til tritium, august 2003:

$$A = A_0 e^{-\frac{t \ln 2}{T_{1/2}}} = 0,54mCi / ml \times e^{-\frac{1,08 \ln 2}{12,32}} = 0,51mCi / ml$$

Vi tilsette 0,46 ml tritium til 150 ml medium, som gjev ein aktivitet på (0,46ml×0,51mCi/ml) 0,235 mCi per 150 ml medium.

Spesifikk aktivitet i radioaktivt medium:

$$S = \frac{0,235mCi}{1,0mM \times 0,1520l} = 1,5Ci / mol$$

Forventa aktivitet per volumeining med omsyn på desintegrasjon:

$$A_v = \frac{0,235mCi \times 37MBq / mCi}{151,96ml} = 5,7 \times 10^4 Bq / ml$$

Nedanfor er oppskriftene på medium med kald valin og radioaktivt medium vist:

Medium med kald valin

RPMI eller MEM fullmedium	150 ml
Kald valin (82,9 mM)	1,5 ml

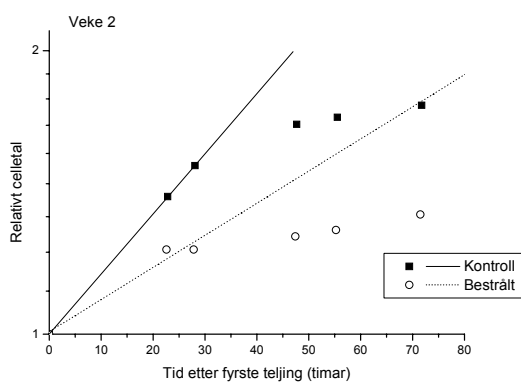
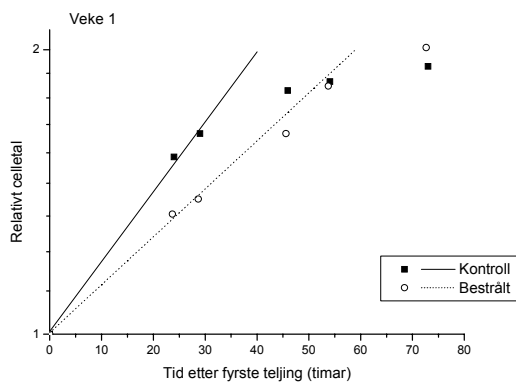
Medium med spesifikk aktivitet 1,5 Ci/mol

(når det er teke omsyn til desintegrasjon)

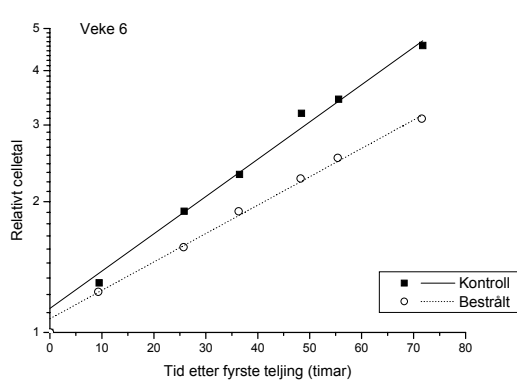
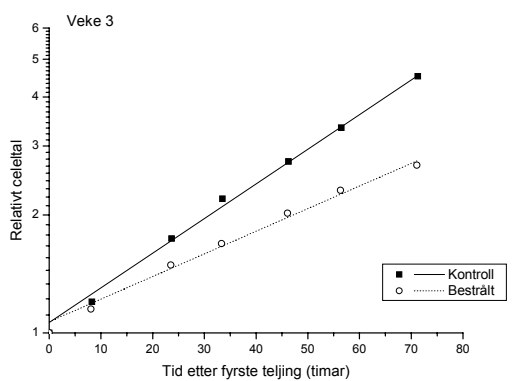
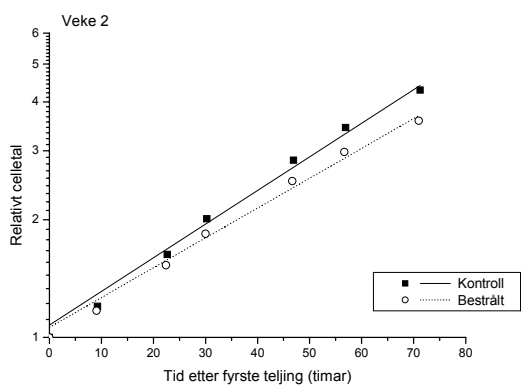
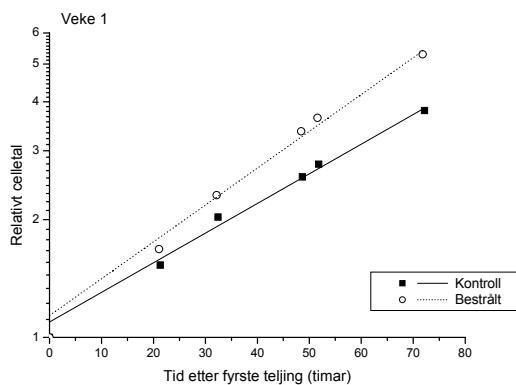
RPMI eller MEM fullmedium	150 ml
Kald valin (82,9 mM)	1,5 ml
[³ H]-valin (0,51 mCi/ml)	0,46 ml

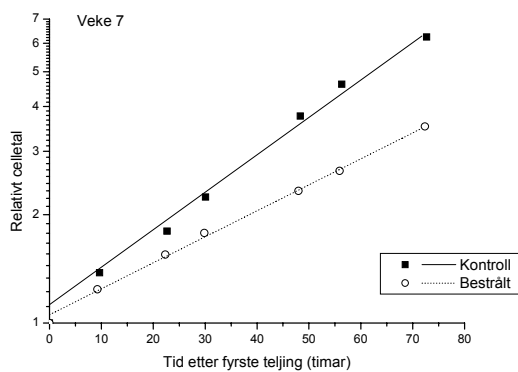
Appendiks F: Vekstkurver

Forsøk D1: T-47D

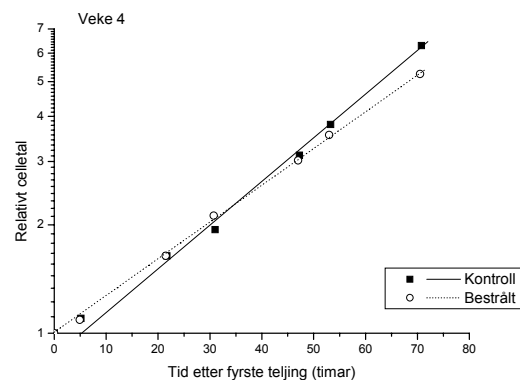
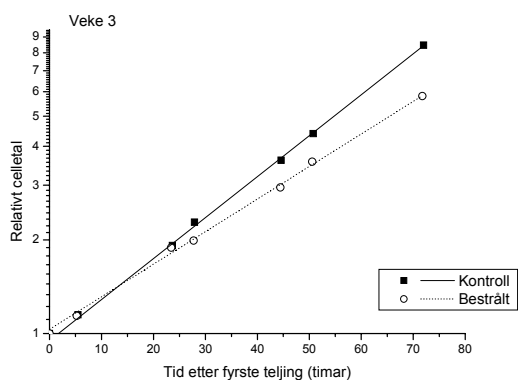
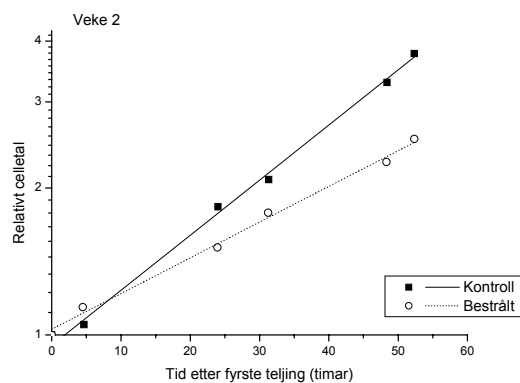
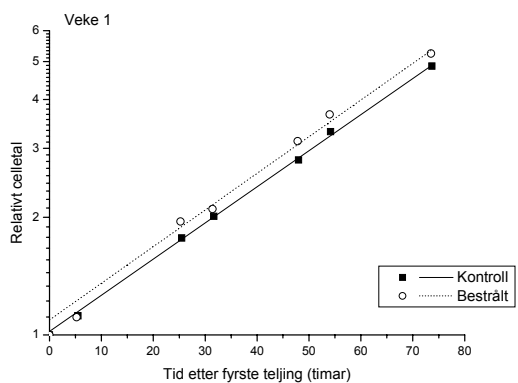


Forsøk D2: T-47D

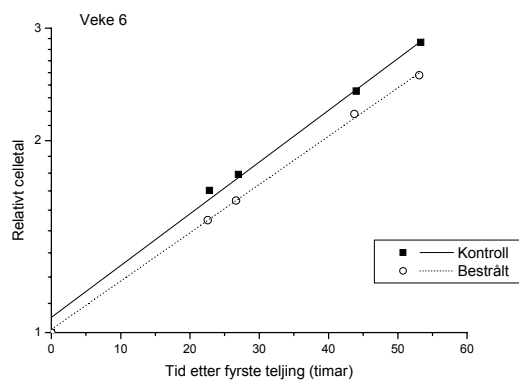
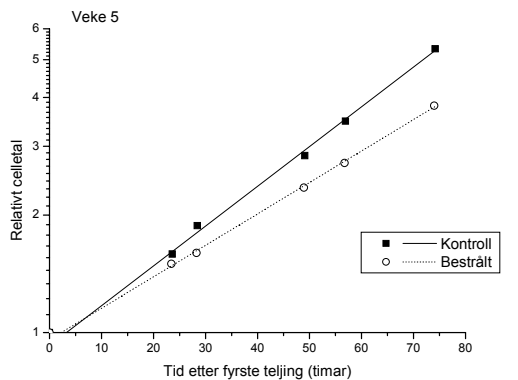


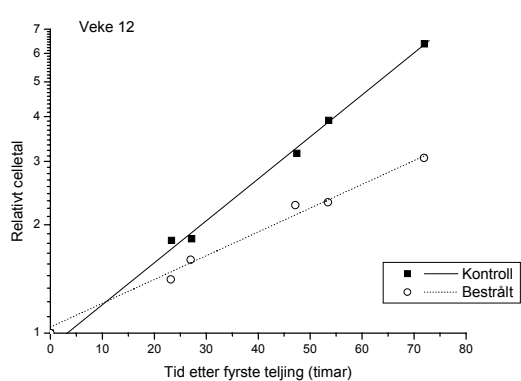
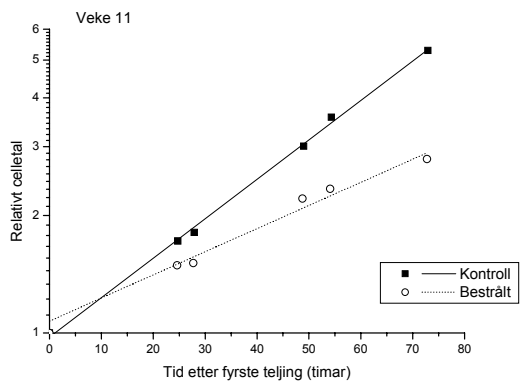
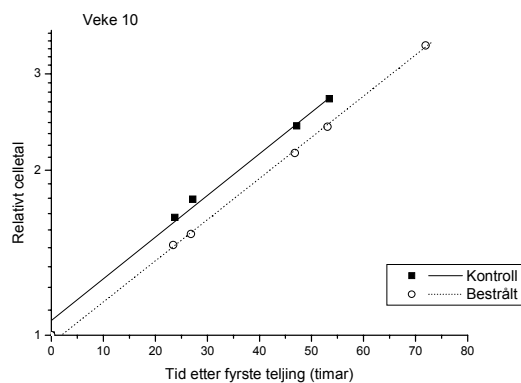
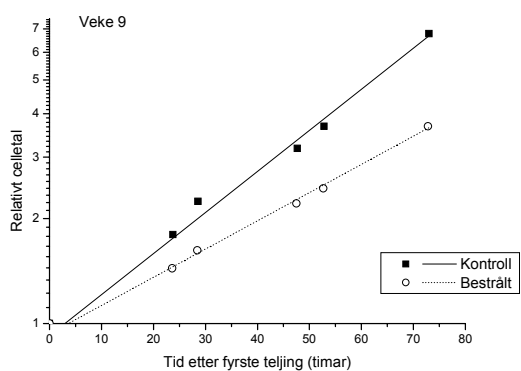
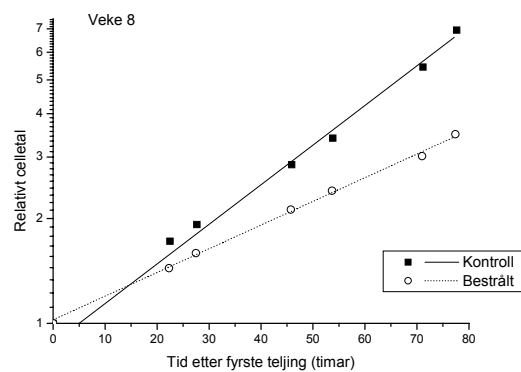
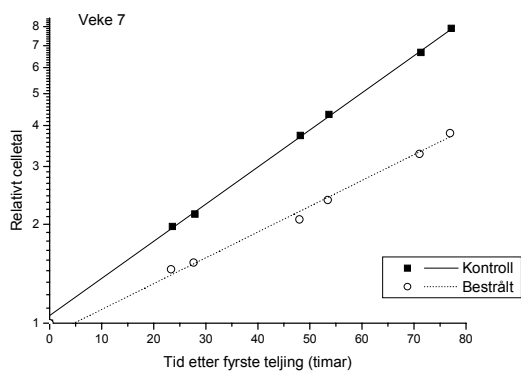


Forsøk D3: T-47D

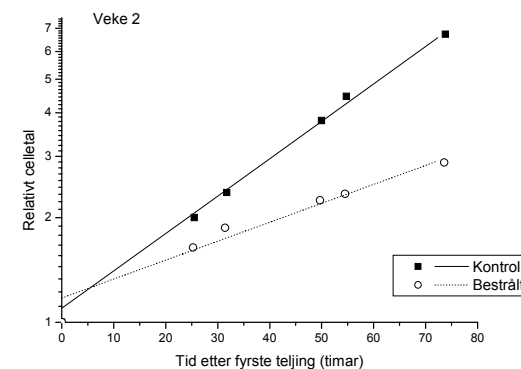
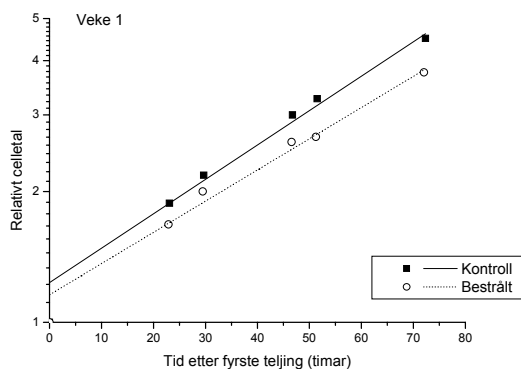


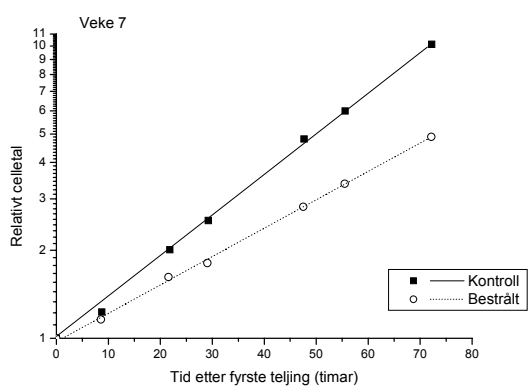
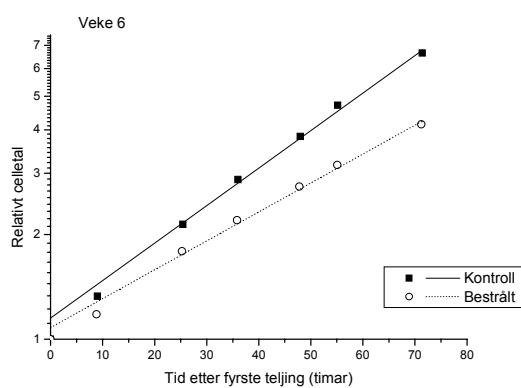
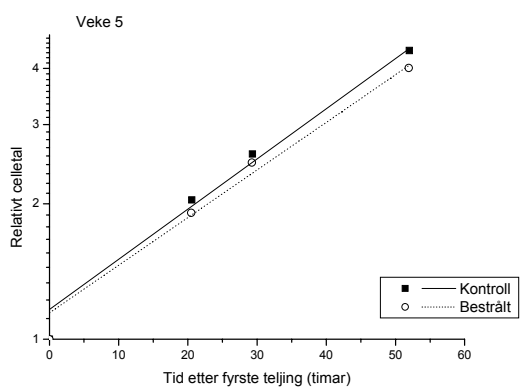
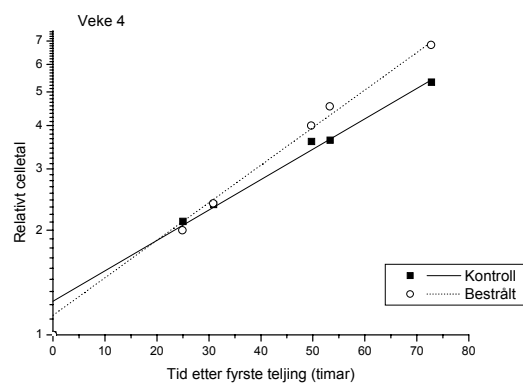
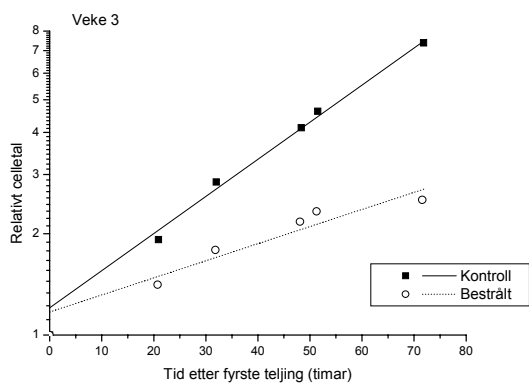
Forsøk D4: T-47D



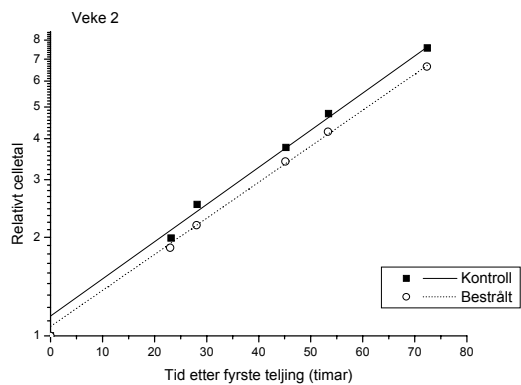
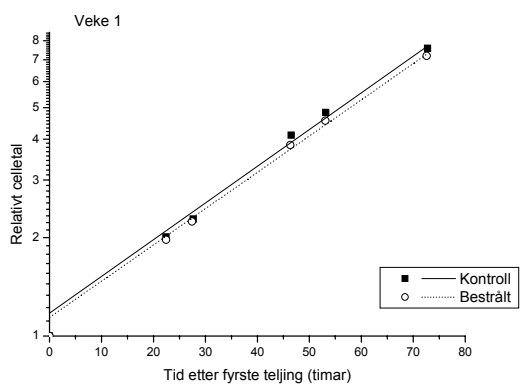


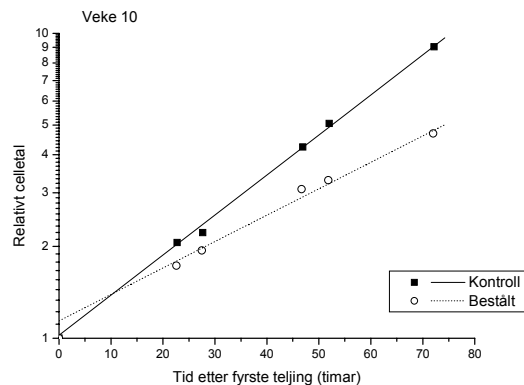
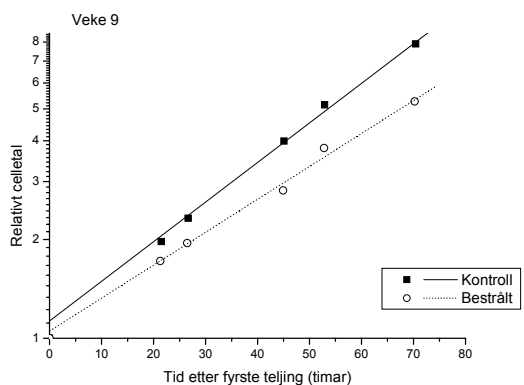
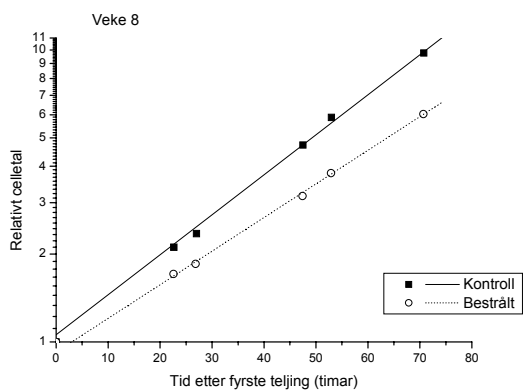
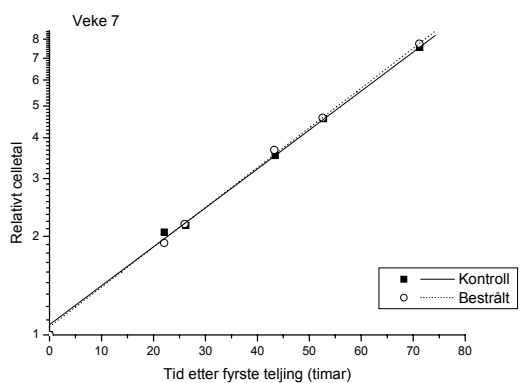
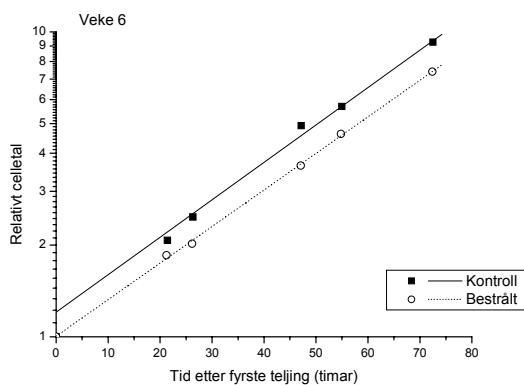
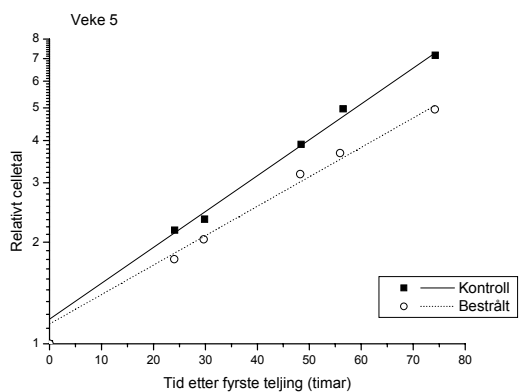
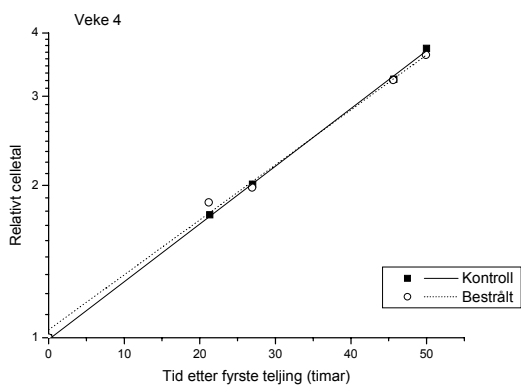
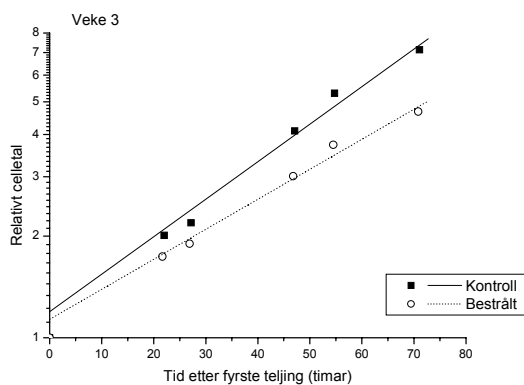
Forsøk D5: NHIK 3025

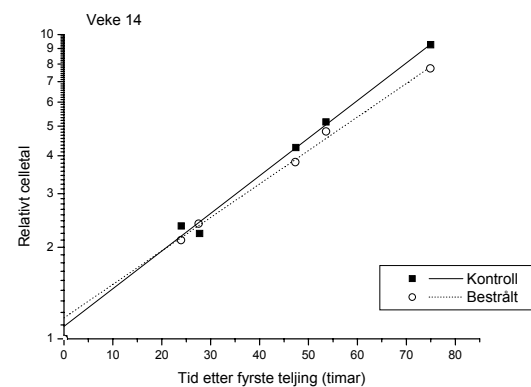
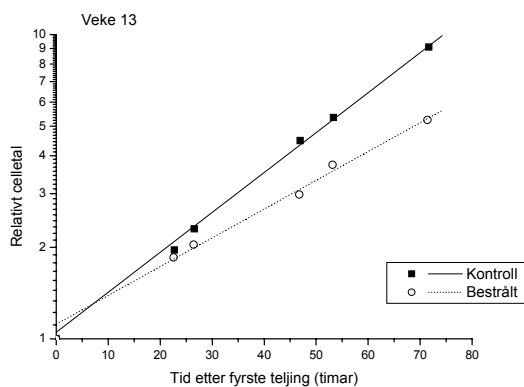
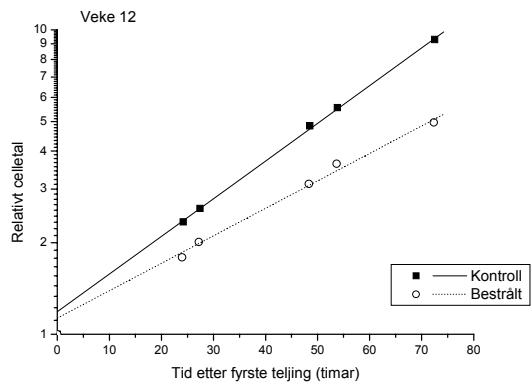
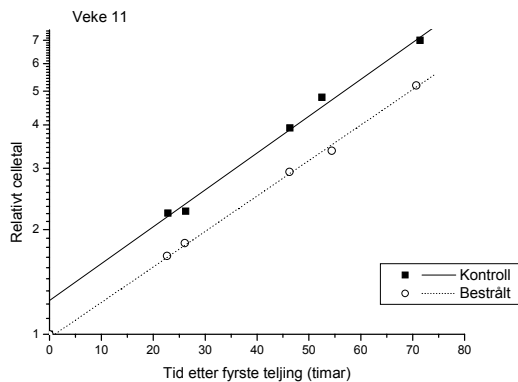




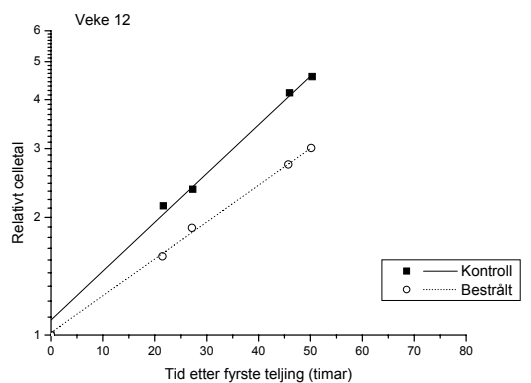
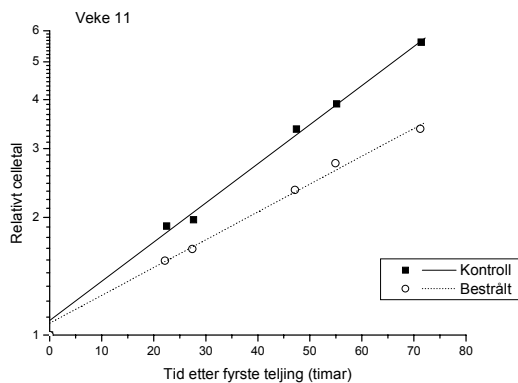
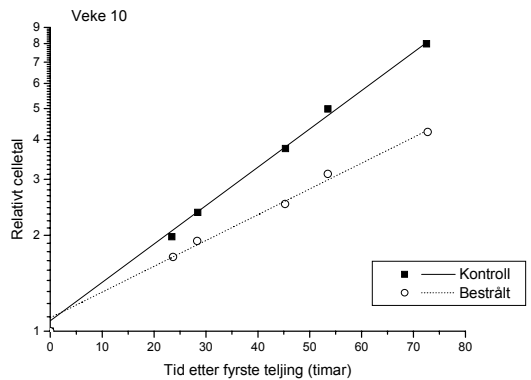
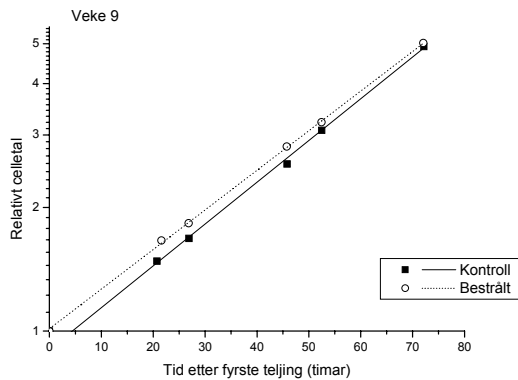
Forsøk D6: NHIK 3025

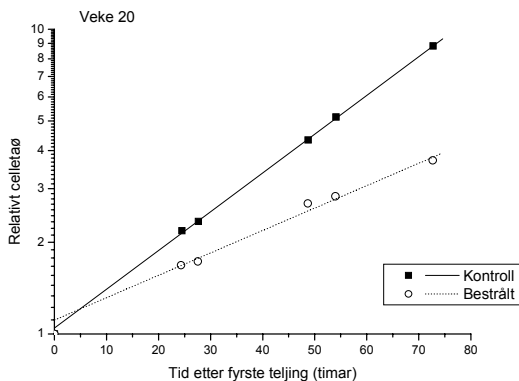
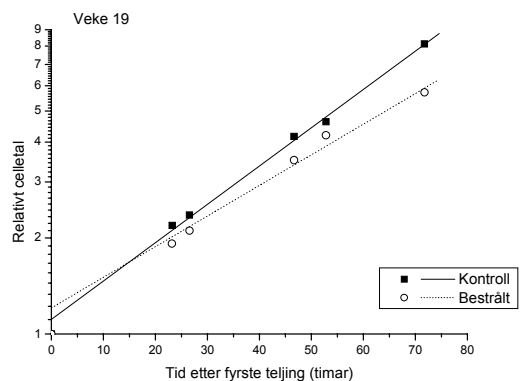
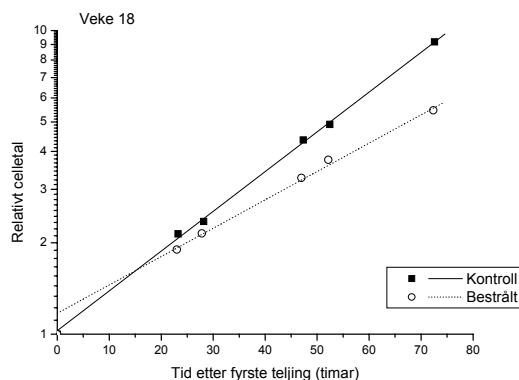
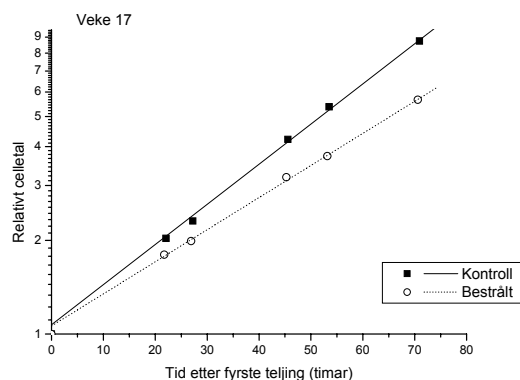
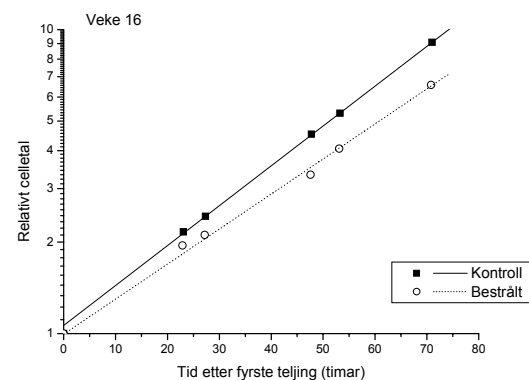
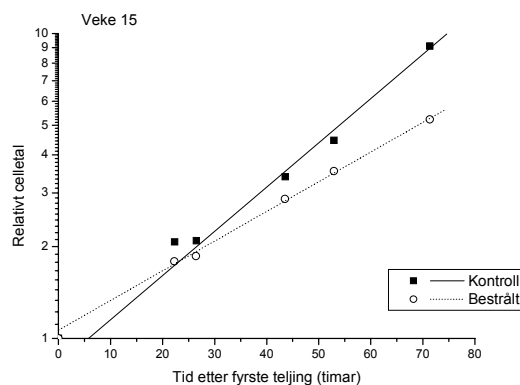
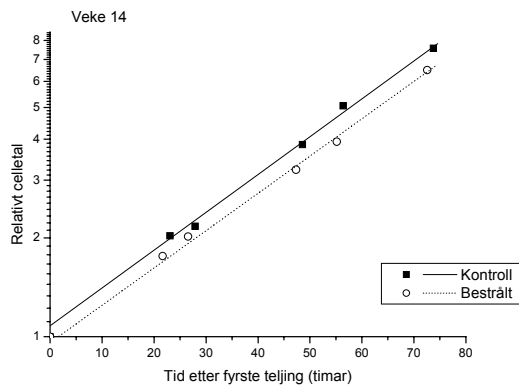
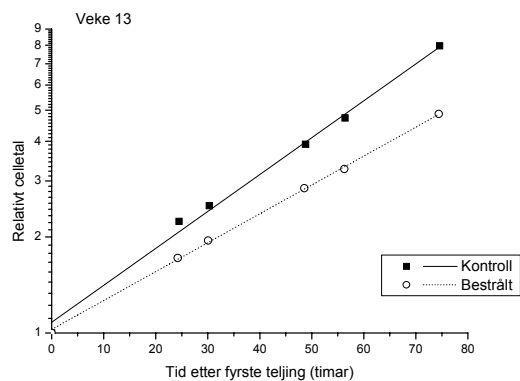


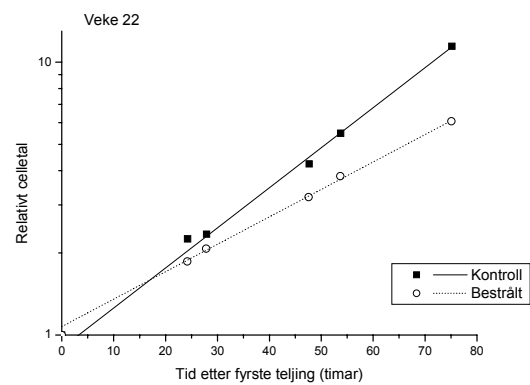
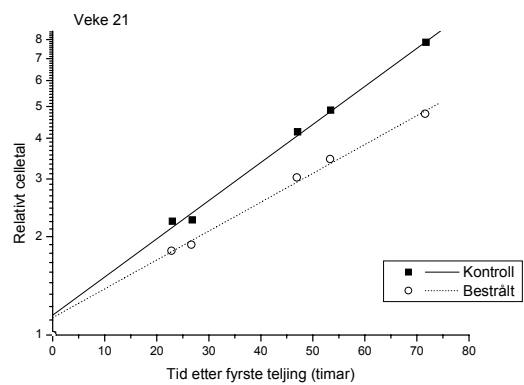




Forsøk D7: NHIK 3025







Appendiks G: Rådata frå celleoverlevingsforsøk

Tabell G1: Forsøk O1: T-47D

		Veke 1		Veke 2		Veke 5		Veke 6	
	Dose (Gy)	kontroll	3,50	kontroll	6,47	kontroll	15,83	kontroll	19,00
	skål 1	155	131	209	121	206	100	218	83
	skål 2	145	110	172	116	199	93	206	95
	skål 3	137	109	208	125	186	80	221	99
	skål 4	143	121	190	132	208	92	251	99
	skål 5	181	144	186	154	216	119	172	109
Tal på utsådde celler N_0		200	200	200	200	200	200	200	200
Gjennomsnittleg tal koloniar per skål: N		152,2	123	193	129,6	203	96,8	213,6	97
	PE	0,761		0,965		1,015		1,068	
	ΔN	7,76	6,61	7,00	6,64	5,04	6,41	12,77	4,20
Overlevingsfraksjon: SF			0,808		0,672		0,477		0,454
	ΔSF		0,060		0,042		0,034		0,034

Tabell G2: Forsøk O2: T-47D

		Veke 1		Veke 2		Veke 3		Veke 4	
	Dose (Gy)	kontroll	3,02	kontroll	5,54	kontroll	8,06	kontroll	10,58
	skål 1	166	94	191	125	167	96	78	64
	skål 2	156	67	186	121	155	139	82	56
	skål 3	159	89	218	107	167	103	97	58
	skål 4	182	76	165	100	160	86	82	60
	skål 5	176	84	157	96	146	135	96	64
Tal på utsådde celler N₀	200	200	200	200	200	200	200	200	200
Gjennomsnittleg tal koloniar per skål: N	167,8	82	183,4	109,8	159	111,8	87	60,4	
	PE	0,839		0,917		0,795		0,435	
	ΔN	4,94	4,79	10,72	5,70	3,96	10,66	3,95	1,60
Overlevingsfraksjon: SF		0,489		0,599		0,703		0,694	
	ΔSF		0,032		0,047		0,069		0,036

		Veke 5		Veke 6		Veke 7		Veke 8	
	Dose (Gy)	kontroll	13,10	kontroll	15,62	kontroll	18,14	kontroll	20,66
	skål 1	66	50	167	56	133	82	224	87
	skål 2	76	47	176	74	124	58	196	78
	skål 3	78	41	130	66	137	97	184	89
	skål 4	84	40	154	68	137	86	206	89
	skål 5	94	53	161	52	141	87	188	88
Tal på utsådde celler N₀	200	200	200	200	200	200	200	200	200
Gjennomsnittleg tal koloniar per skål: N	79,6	46,2	157,6	63,2	134,4	82	199,6	86,2	
	PE	0,398		0,788		0,672		0,998	
	ΔN	4,62	2,52	7,79	4,03	2,89	6,49	7,17	2,08
Overlevingsfraksjon: SF		0,580		0,401		0,610		0,432	
	ΔSF		0,046		0,032		0,050		0,017

		Veke 9		Veke 10		Veke 11	
	Dose (Gy)	kontroll	23,18	kontroll	25,70	kontroll	28,22
	skål 1	204	106	133	61	203	123
	skål 2	185	115	131	66	214	112
	skål 3	160	82	157	64	212	118
	skål 4	188	88	124	59	192	112
	skål 5	195	105	132	52	222	144
Tal på utsådde celler N₀	200	200	200	200	200	200	200
Gjennomsnittleg tal koloniar per skål: N	186,4	99,2	135,4	60,4	208,6	121,8	
	PE	0,932		0,677		1,043	
	ΔN	7,37	6,13	5,63	2,42	5,13	5,92
Overlevingsfraksjon: SF		0,532		0,446		0,584	
	ΔSF		0,039		0,026		0,032

Tabell G3: Forsøk O3: NHIK 3025

		Veke 1		Veke 2		Veke 3		Veke 4	
	Dose (Gy)	kontroll	2,44	kontroll	4,26	kontroll	6,10	kontroll	7,96
	skål 1	219	151	72	94	187	75	121	95
	skål 2	195	127	107	97	168	70	121	78
	skål 3	173	115	99	95	165	86	128	104
	skål 4	185	130	114	100	204	77	116	94
	skål 5	207	136	135	117	155	77	114	75
Tal på utsådde celler N₀		200	200	200	200	200	200	200	200
Gjennomsnittleg tal koloniar per skål: N		195,8	131,8	105,4	100,6	175,8	77	120	89,2
	PE	0,979		0,527		0,879		0,600	
	ΔN	8,06	5,89	10,27	4,23	8,75	2,59	2,43	5,49
Overlevingsfraksjon: SF			0,673		0,954		0,438		0,743
	ΔSF		0,041		0,101		0,026		0,048

		Veke 5		Veke 6	
	Dose (Gy)	kontroll	9,82	kontroll	11,68
	skål 1	285	186	99	94
	skål 2	229	203	103	96
	skål 3	229	171	113	85
	skål 4	294	162	105	64
	skål 5	268	156	90	88
Tal på utsådde celler N₀		200	200	200	200
Gjennomsnittleg tal koloniar per skål: N		261	175,6	102	85,4
	PE	1,305		0,510	
	ΔN	13,72	8,51	3,77	5,71
Overlevingsfraksjon: SF			0,671		0,837
	ΔSF		0,048		0,064

Tabell G4: Forsøk O4: NHIK 3025

		Veke 1		Veke 2		Veke 3		Veke 4	
	Dose (Gy)	kontroll	2,44	kontroll	4,26	kontroll	6,10	kontroll	7,96
	skål 1	255	142	184	60	137	102	170	89
	skål 2	211	128	202	69	165	132	170	120
	skål 3	258	129	203	52	144	109	191	100
	skål 4	237	144	200	56	177	93	168	117
	skål 5	237	165	222	64	149	95	152	119
Tal på utsådde celler N₀	200	200	200	200	200	200	200	200	200
Gjennomsnittleg tal koloniar per skål: N	239,6	141,6	202,2	60,2	154,4	106,2	170,2	109	
	PE	1,198		1,011		0,772		0,851	
	ΔN	8,39	6,70	6,04	2,97	7,29	7,04	6,20	6,19
Overlevingsfraksjon: SF		0,591		0,298		0,688		0,640	
	ΔSF		0,035		0,017		0,056		0,043

		Veke 5		Veke 6		Veke 7		Veke 8	
	Dose (Gy)	kontroll	9,82	kontroll	11,68	kontroll	13,55	kontroll	15,42
	skål 1	137	137	139	111	265	89	179	96
	skål 2	160	137	122	116	277	86	163	110
	skål 3	144	122	134	97	267	91	175	92
	skål 4	170	119	118	110	272	94	157	104
	skål 5	141	131	155	94	273	118	179	117
Tal på utsådde celler N₀	200	200	200	200	200	200	200	200	200
Gjennomsnittleg tal kolonier par skål: N	150,4	129,2	133,6	105,6	270,8	95,6	170,6	103,8	
	PE	0,752		0,668		1,354		0,853	
	ΔN	6,27	3,75	6,58	4,27	2,15	5,75	4,49	4,54
Overlevingsfraksjon: SF		0,859		0,790		0,353		0,608	
	ΔSF		0,044		0,050		0,021		0,031

		Veke 9		Veke 10		Veke 11	
	Dose (Gy)	kontroll	17,29	kontroll	19,16	kontroll	21,03
	skål 1	195	112	198	208	164	119
	skål 2	203	128	182	210	140	138
	skål 3	164	135	205	192	137	130
	skål 4	187	120	188	196	127	113
	skål 5	155	168	235	194	173	97
Tal på utsådde celler N₀	200	200	200	200	200	200	200
Gjennomsnittleg tal koloniar per skål: N	180,8	132,6	201,6	200	148,2	119,4	
	PE	0,904		1,008		0,741	
	ΔN	9,17	9,65	9,24	3,74	8,68	7,08
Overlevingsfraksjon: SF		0,733		0,992		0,806	
	ΔSF		0,065		0,049		0,067

Tabell G5: Forsøk O5: NHIK 3025

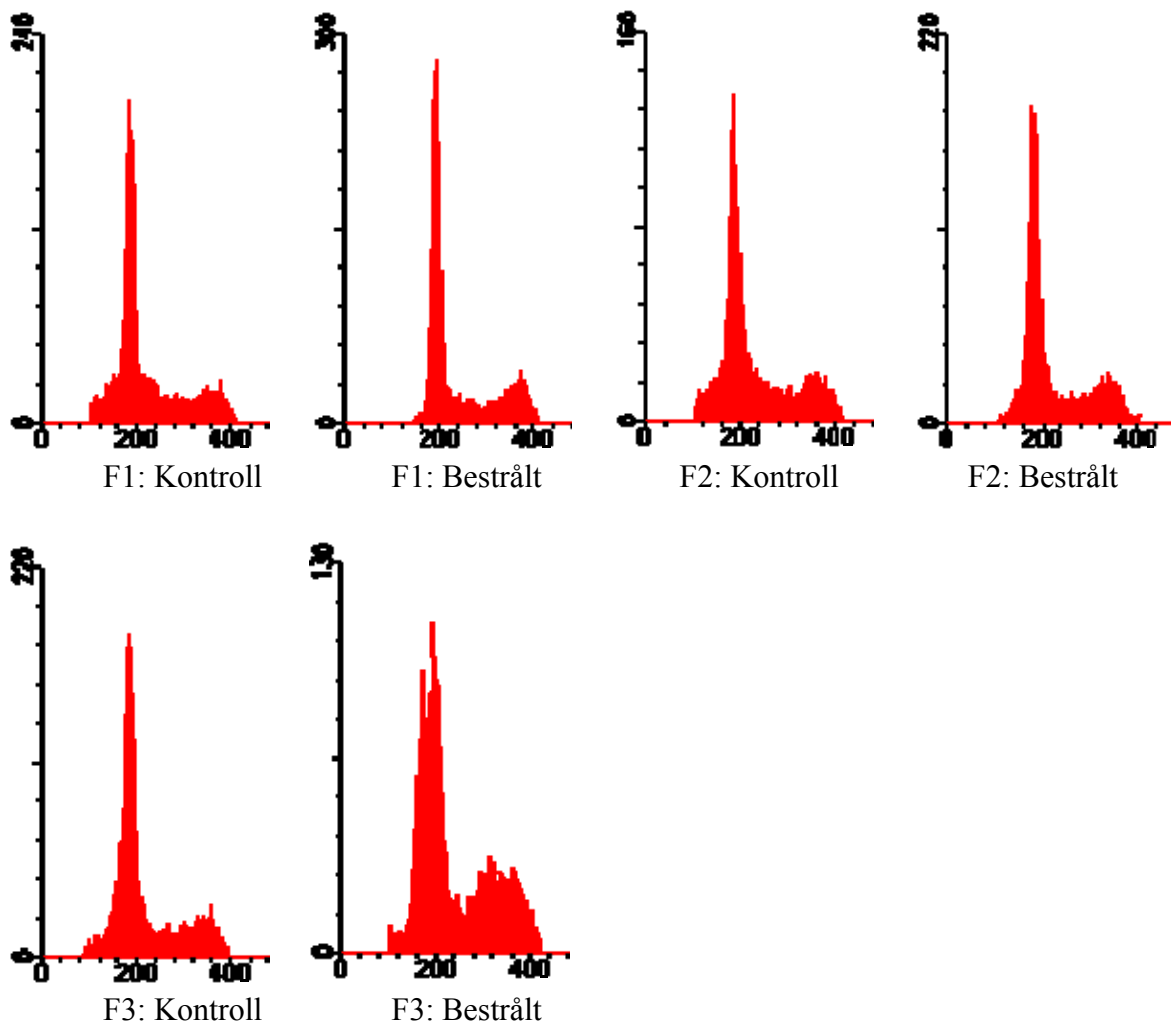
	Dose (Gy)	Veke 9		Veke 10		Veke 11		Veke 12	
		kontroll	17,29	kontroll	19,16	kontroll	21,03	kontroll	22,91
skål 1	108	74	107	60	117	58	131	90	
skål 2	122	121	116	57	134	79	109	97	
skål 3	112	102	104	61	106	74	150	90	
skål 4	105	105	106	58	119	89	134	99	
skål 5	129	99	166	59	108	101	122	106	
Tal på utsådde celler N_0	200	200	200	200	200	200	200	200	200
Gjennomsnittleg tal koloniar per skål: N	115,2	100,2	119,8	59	116,8	80,2	129,2	96,4	
PE	0,576		0,599		0,584		0,646		
ΔN	4,49	7,57	11,73	0,71	4,97	7,22	6,78	3,01	
Overlevingsfraksjon: SF		0,870		0,492		0,687		0,746	
ΔSF		0,074		0,049		0,068		0,046	

	Dose (Gy)	Veke 13		Veke 14		Veke 15		Veke 16	
		kontroll	24,78	kontroll	26,66	kontroll	28,54	kontroll	30,41
skål 1	156	113	128	95	177	132	136	137	
skål 2	140	93	160	100	172	96	114	155	
skål 3	145	97	133	105	211	90	113	142	
skål 4	161	114	143	87	158	123	126	150	
skål 5	209	93	174	97	221	127	145	144	
Tal på utsådde celler N_0	200	200	200	200	200	200	200	200	200
Gjennomsnittleg tal koloniar per skål: N	162,2	102	147,6	96,8	187,8	113,6	126,8	145,6	
PE	0,811		0,738		0,939		0,634		
ΔN	12,29	4,75	8,57	2,97	12,03	8,58	6,21	3,14	
Overlevingsfraksjon: SF		0,629		0,656		0,605		1,148	
ΔSF		0,056		0,043		0,060		0,061	

	Dose (Gy)	Veke 17		Veke 18		Veke 19		Veke 20	
		kontroll	32,29	kontroll	34,17	kontroll	36,04	kontroll	37,92
skål 1	176	191	111	108	170	107	234	146	
skål 2	150	150	133	111	157	96	215	139	
skål 3	183	139	174	96	123	119	195	144	
skål 4	180	163	182	98	155	128	198	120	
skål 5	155	194	155	96	147	108	206	142	
Tal på utsådde celler N_0	200	200	200	200	200	200	200	200	200
Gjennomsnittleg tal koloniar per skål: N	168,8	167,4	151	101,8	150,4	111,6	209,6	138,2	
PE	0,844		0,755		0,752		1,048		
ΔN	6,79	10,94	13,10	3,20	7,78	5,48	7,02	4,69	
Overlevingsfraksjon: SF		0,992		0,674		0,742		0,659	
ΔSF		0,076		0,062		0,053		0,031	

Appendiks H: DNA-histogram

T-47D:



NHIK 3025:

